

Cara uji air minum dalam kemasan



© BSN 2015

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

| | |
|--|----|
| Daftar isi..... | i |
| Prakata | iv |
| Pendahuluan..... | v |
| 1 Ruang lingkup..... | 1 |
| 2 Acuan normatif..... | 1 |
| 3 Cara uji | 1 |
| 3.1 Persiapan contoh..... | 1 |
| 3.2 Keadaan | 1 |
| 3.2.1 Bau dan rasa | 1 |
| 3.2.2 Rasa berkarbonasi..... | 1 |
| 3.2.3 Warna | 2 |
| 3.3 pH | 4 |
| 3.4 Kekeruhan | 5 |
| 3.5 Zat yang terlarut..... | 7 |
| 3.6 Zat organik (angka KMnO_4)..... | 10 |
| 3.7 Total organik karbon | 16 |
| 3.8 Nitrat | 18 |
| 3.9 Nitrit | 19 |
| 3.10 Amonium..... | 21 |
| 3.11 Sulfat..... | 23 |
| 3.12 Klorida..... | 24 |
| 3.13 Fluorida..... | 26 |
| 3.14 Sianida..... | 27 |
| 3.15 Besi (Fe) | 30 |
| 3.16 Mangan..... | 31 |
| 3.17 Klor bebas..... | 32 |
| 3.18 Kromium (Cr) | 35 |
| 3.19 Barium (Ba)..... | 36 |
| 3.20 Selenium (Se)..... | 37 |
| 3.21 Perak (Ag)..... | 40 |
| 3.22 Boron (B) | 43 |
| 3.23 Bromat | 46 |
| 3.24 Kadar karbon dioksida (CO_2) bebas | 55 |
| 3.25 Kadar oksigen (O_2) terlarut | 57 |
| 3.26 Cemarkan logam | 59 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 3.26.1 | Timbal (Pb) | 59 |
| 3.26.2 | Tembaga (Cu)..... | 61 |
| 3.26.3 | Kadmium (Cd)..... | 62 |
| 3.26.4 | Raksa (Hg)..... | 63 |
| 3.26.5 | Cemaran arsen (As)..... | 64 |
| 3.26.6 | Antimon (Sb)..... | 66 |
| 3.26.7 | Nikel (Ni) | 68 |
| 3.26.8 | Metode uji total logam secara inductively coupled plasma (ICP)..... | 69 |
| 3.27 | Cemaran kimia organik | 73 |
| 3.27.1 | Aldrin dan dieldrin; Heptaklorepoksida; Metoksiklor | 73 |
| 3.27.2 | Detergen (Spektrofotometer secara biru metilen)..... | 81 |
| 3.27.3 | 1,2-dikloroetana | 84 |
| 3.27.4 | Minyak mineral..... | 91 |
| 3.27.5 | PCB..... | 100 |
| 3.28 | Cemaran mikroba | 111 |
| 3.28.1 | Angka lempeng total | 111 |
| 3.28.2 | Bakteri koliform dan <i>Escherichia coli</i> | 117 |
| 3.28.3 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 125 |
| 3.28.4 | <i>Enterococci</i> | 130 |
| 3.28.5 | Bakteri anaerob pereduksi sulfat pembentuk spora..... | 134 |
| | Bibliografi | 139 |
| | Tabel 1 - Pencatatan hasil warna | 3 |
| | Tabel 2 - Pelaporan hasil pembacaan | 6 |
| | Tabel 3 - Panjang Gelombang yang disarankan, Estimasi Level Deteksi, Panjang Gelombang Alternatif, Limit Konsentrasi terendah dan Limit Konsentrasi Tertinggi..... | 70 |
| | Tabel 4 - Presisi dan Data Bias ICP | 72 |
| | Tabel 5 - Kondisi kromatografi gas, abstrak nomor layanan pendaftaran kimia, kodeidentifikasi puncak, relatif waktu retensi dan perkiraan limit deteksi metode untuk 4 pestisida organoklorin | 77 |
| | Tabel 6 – Hasil kajian antar laboratorium untuk 4 pestisida organoklorin dalam air..... | 78 |
| | Tabel 7 - Standar pengawasan mutu alat..... | 80 |
| | Tabel 8 – Ion primer kuantitatif, waktu retensi dan tingkat deteksi metode/ <i>method detection level</i> (MDL)..... | 88 |
| | Tabel 9 - Kunci BFB m / z kriteria kelimpahan (<i>abundance criteria</i>)..... | 89 |
| | Tabel 10 – Contoh kondisi kromatografi gas dari standar minyak mineral pada contoh air .. | 97 |
| | Tabel 11 – Titik didih dari n-alkana | 100 |
| | Tabel 12 - Kondisi kromatografik dan <i>method detection level</i> (MDL) | 103 |
| | Tabel 13 – QC Kriteria keberterimaan* | 110 |

| | |
|---|-----|
| Tabel 14 – Presisi metode dan bias sebagai fungsi konsentrasi..... | 111 |
| Tabel 15 - Persyaratan air <i>grade 3</i> | 112 |
| Gambar 1 – Skema sistem kromatografi ion termasuk <i>in-line PCR system</i> | 50 |
| Gambar 2 – Gambaran grafis dari parameter untuk menghitung resolusi puncak, <i>R</i> | 50 |
| Gambar 3 – Contoh kromatogram larutan standar sesuai dengan Standar Internasional | 52 |
| Gambar 4 – Kromatogram dari contoh uji air minum sesuai dengan Standar Internasional . | 53 |
| Gambar 5 - Kromatogram GC / ECD senyawa grup A yang dianalisis dengan kolom kapiler 30 m × 0,25 mm id DB-5 <i>fused silica</i> (film 0,25 µm)..... | 78 |
| Gambar 6 - Kromatogram GC / ECD senyawa grup B yang dianalisis dengan kolom kapiler 30 m × 0,25 mm id DB-5 <i>fused-silica</i> (film 0,25 µm)..... | 79 |
| Gambar 7 - Alat pembilas (<i>purging device</i>) | 85 |
| Gambar 8 - Prosedur dan konstruksi bahan penjerap dengan menyertakan kemampuan <i>desorpsi</i> (<i>desorb capability</i>) | 86 |
| Gambar 9 - Kromatogram GC/MS 1,2- <i>dichloroethane</i> . Kondisi GC: kolom J & W DB-624, 30 m, 0,25 mm ID, 1,4 µm ketebalan lapisan tipis/film; program suhu: 35 °C, 4 menit; 4 °C/menit; 50 °C, 0 menit; 10 °C/menit; 175 °C, 4 menit. | 88 |
| Gambar 10 – Mikroseparator..... | 94 |
| Gambar 11 – Contoh kolom <i>clean-up</i> | 95 |
| Gambar 12 - Kromatogram gas larutan standar (0,5 mg/L)..... | 99 |
| Gambar 13 –Kromatogram dari campuran pestisida. Kolom DB-5, panjang 30 m, program suhu multilevel, detektor electron-capture | 102 |
| Gambar 14 – Kromatogram gas dari PCB-1016. Kolom 1,5% SP-2250/1,95%SP-2401 pada <i>Supelcoport</i> ; suhu 160 °C; detektor: penangkap elektron | 106 |
| Gambar 15 – Kromatogram gas dari PCB-1221. Kolom 1,5% SP-2250/1,95% SP-2401 pada <i>Supelcoport</i> ; suhu 160 °C; detektor: penangkap elektron | 107 |
| Gambar 16 - Kromatogram gas dari PCB-1232. Kolom 1,5% SP-2250/1,95% SP-2401 pada <i>Supelcoport</i> ; suhu 160 °C; detektor: penangkap elektron | 107 |
| Gambar 17 – Kromatogram gas dari PCB-1242. Kolom 1,5% SP-2250/1,95% SP-2401 pada <i>Supelcoport</i> ; suhu 160 °C; detektor: penangkap elektron | 108 |
| Gambar 18 – Kromatogram gas dari PCB-1248. Kolom 1,5% SP-2250/1,95% SP-2401 pada <i>Supelcoport</i> ; suhu 160 °C; detector: penangkap elektron | 108 |
| Gambar 19 – Kromatogram gas dari PCB-1254. Kolom 1,5% SP-2250/1,95% SP-2401 pada <i>Supelcoport</i> ; suhu 200 °C; detektor: penangkap elektron | 109 |
| Gambar 20 – Kromatogram gas dari PCB-1260. Kolom 1,5% SP-2250/1,95% SP-2401 pada <i>Supelcoport</i> ; suhu 200 °C; detektor: penangkap elektron | 109 |

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Cara uji air minum dalam kemasan* ini merupakan revisi SNI 01-3554-2006, *Cara uji air minum dalam kemasan*. Standar ini direvisi dan dirumuskan dengan tujuan untuk:

1. Menyelaraskan metode uji sesuai dengan persyaratan mutu pada revisi SNI air minum dalam kemasan (SNI air mineral, SNI air demineral, dan SNI air mineral alami) yang mengacu pada SNI ini;
2. Menyesuaikan dengan perkembangan metode pengujian terkini dan rekomendasi Codex

Perubahan teknis penting pada standar ini adalah:

1. Penambahan metode uji dari sebelumnya hanya untuk parameter mutu air mineral dan air demineral menjadi ditambahkan metode uji untuk air mineral alami
2. Penggunaan metode uji menggunakan metode sesuai rekomendasi Codex

Standar ini sebelumnya dirumuskan oleh **Komite Teknis 67-04 Makanan dan Minuman**, dan kini direvisi secara bersama oleh **Komite Teknis 19-05, Metode dan Pengujian Mikrobiologi** untuk parameter mikrobiologi dan **Komite Teknis 19-06, Metode dan Pengujian Umum Kimia Pangan** untuk parameter Kimia. Standar ini telah dibahas melalui rapat-rapat teknis oleh masing-masing Komite Teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 2 April 2015 di Jakarta oleh Komite Teknis 19-06, dan tanggal 6 April 2015 di Jakarta oleh Komite Teknis 19-05.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 18 Mei 2015 sampai dengan 16 Juni 2015 dengan hasil akhir RASNI.

Pendahuluan

Revisi SNI 01-3554-2006, *Cara uji air minum dalam kemasan* dilakukan secara bersama oleh Komite Teknis 19-05, Metode dan Pengujian Mikrobiologi untuk parameter mikrobiologi dan Komite Teknis 19-06, Metode dan Pengujian Umum Kimia Pangan. Hal ini dilakukan sesuai kesepakatan dengan Komite Teknis 67-04 Makanan dan Minuman yang akan lebih fokus dalam penyusunan SNI produk.

Dalam revisi SNI ini, terdapat penambahan, perubahan metode uji, serta metode uji yang tidak diubah sesuai SNI 01-3554-2006 antara lain :

1. Penambahan parameter kimia : Rasa karbonasi, Bromat, Kadar karbon dioksida (CO₂) bebas, Kadar oksigen (O₂), Aldrin dan dieldrin, 1,2-dikloroetana, Heptaklorepoksida, Metoksiklor, Detergen, PCBs, dan Minyak mineral.
2. Perubahan cara uji parameter kimia : Boron (B), Antimon (Sb), Nikel (Ni),.
3. Perubahan cara uji parameter mikrobiologi : Angka lempeng total, Koliform, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococci*, dan Bakteri anaerob pereduksi sulfit pembentuk spora.

Metode uji yang terdapat pada SNI ini khususnya parameter mikrobiologi sesuai dengan metode uji yang terdapat pada CAC/RCP 33-1985 *Code of Hygienic Practice for Collecting, Processing and Marketing of Natural Mineral Waters*, yaitu sesuai standar ISO.

Standar ISO yang digunakan dalam acuan normatif pada saat penetapan SNI ini memiliki status termutakhir atau telah diadopsi identik menjadi SNI, sebagai berikut :

1. ISO 7218:2007 *Microbiology of food and animal feeding stuffs -- General requirements and guidance for microbiological examinations*, dan telah diadopsi secara identik menjadi SNI ISO 7218:2012, Mikrobiologi bahan pangan dan pakan – Persyaratan umum dan panduan untuk pengujian mikrobiologi.

Cara uji air minum dalam kemasan

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan cara uji air minum dalam kemasan.

2 Acuan normatif

Dokumen berikut merupakan bagian tidak terpisahkan untuk penggunaan standar ini. Untuk acuan bertanggal, hanya edisi yang diacu digunakan. Untuk acuan tidak bertanggal, edisi terakhir dari dokumen acuan (termasuk amandemen) digunakan.

ISO 3696, *Water for analytical laboratory use -- Specification and test methods*

ISO 7218, *Microbiology of food and animal feeding stuffs -- General requirements and guidance for microbiological examinations*

3 Cara uji

3.1 Persiapan contoh

Homogenkan contoh dengan cara mengocok, membolak-balikkan kemasan ke atas dan ke bawah.

3.2 Keadaan

3.2.1 Bau dan rasa

3.2.1.1 Prinsip

Tidak menunjukkan bau dan rasa yang tidak normal.

3.2.1.2 Cara kerja

Diuji secara organoleptik

3.2.2 Rasa berkarbonasi

3.2.2.1 Prinsip

Pengamatan contoh uji dengan indera pengecap (lidah) yang dilakukan oleh panelis yang terlatih atau kompeten untuk pengujian organoleptik

3.2.2.2 Cara kerja

- Ambil 100 mL contoh dan masukkan ke dalam gelas yang bersih dan kering;
- Rasakan dengan indera pengecap (lidah); dan
- Lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis yang terlatih atau 1 orang tenaga ahli.

3.2.2.3 Cara menyatakan hasil

- a) Jika tidak terasa asing, maka hasil dinyatakan “normal khas berkarbonasi”; dan
- b) jika terasa rasa asing, maka hasil dinyatakan “tidak normal”.

3.2.3 Warna

3.2.3.1 Visual

3.2.3.1.1 Prinsip

Warna ditentukan dengan perbandingan visual dari contoh terhadap larutan berwarna yang diketahui konsentrasinya. Metode platinum-cobalt adalah metode standar untuk mengukur warna, unit warna adalah warna yang dihasilkan oleh 1 ng platinum/L dalam bentuk ion kloroplatinat. Perbandingan kobalt terhadap platinum sesuai dengan warna air alami.

3.2.3.1.2 Peralatan

- Tabung Nessler 50 mL;
- Gelas ukur 100 mL;
- Buret 10 mL, terkalibrasi;
- Labu ukur 50 mL, terkalibrasi;
- Labu erlenmeyer 100 mL.
- pH meter, untuk menentukan pH contoh
- penyaring dan alat penyaring (untuk mengukur warna asli): gunakan penyaring membran selulosa dengan diameter 22 atau 47 mm dan diameter pori 0,45 μm . *Fiber glass* juga dapat digunakan. Penyaring dengan pori lebih kecil 0,2 atau 0,22 μm atau *ultrafiltration* mungkin diperlukan untuk menghilangkan partikel koloid contoh tertentu seperti Mn atau Fe oksida atau koloid lainnya. Gunakan kaca, TFE atau *stainless steel* untuk menahan filter yang dipilih

3.2.3.1.3 Pereaksi

- Air bebas organik: Air untuk pereaksi (*reagent water*) golongan I atau air yang setara. Gunakan untuk seluruh pembuatan standar dan cara kerja lain.
- Kalium kloroplatinat, K_2PtCl_6 , pa
- Kobalt klorida, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pa
- Natrium klorida, HCl, pa
- Natrium hidroksida, NaOH, pa

Larutan standar:

Larutkan 1,246 g kalium kloroplatinat, K_2PtCl_6 (ekuivalen dengan 500 mg logam platina) dan 1,00 g kobalt klorida, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (ekuivalen dengan 250 mg kobalt) dalam air suling dan 100 mL HCl pekat, encerkan menjadi 1 000 mL dengan air suling. Larutan standar tersebut mempunyai skala warna 500 unit.

3.2.3.1.4 Persiapan contoh

- a. Contoh uji disaring dengan kertas saring berpori 0,45 μm , dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer.
- b. Contoh siap diuji.

3.2.3.1.5 Cara kerja

Bandingkan warna contoh dengan warna standar dalam tabung Nessler 50 mL dengan melihat vertikal lurus tabung yang diberi alas warna putih. Jika warna contoh lebih dari

70 unit, encerkan contoh dengan air suling dalam bagian yang diketahui sehingga volumenya 50 mL dan warna masuk ke dalam deret standar.

3.2.3.1.6 Perhitungan

a) Perhitungan warna

$$\text{Unit warna} = \frac{A \times 50}{B}$$

keterangan:

A adalah perkiraan warna dari contoh yang diencerkan

B adalah volume contoh yang diencerkan, (mL).

Pelaporan hasil warna dalam setiap bilangan pembacaan dan catatan mengikuti tabel 1 berikut:

Tabel 1 - Pencatatan hasil warna

| Nomor | Unit warna | Hasil yang dicatat |
|-------|------------|--------------------|
| 1 | 1 – 50 | 1 |
| 2 | 51 – 100 | 5 |
| 3 | 101 – 250 | 10 |
| 4 | 251 – 500 | 20 |

3.2.3.2 Metode spektrofotometrik

3.2.3.2.1 Prinsip

Warna ditentukan secara spektrofotometri pada panjang gelombang antara 450 nm dan 465 nm, dengan larutan standar platina-cobalt mengikuti Hukum Beer.

3.2.3.2.2 Peralatan

- Spektrofotometer
- penyaring dan alat penyaring (untuk mengukur warna asli): gunakan penyaring membran selulosa dengan diameter 22 mm atau 47 mm dan diameter pori 0,45 µm. *Fiber glass* juga dapat digunakan. Penyaring dengan pori lebih kecil 0,2 µm atau 0,22 µm atau *ultra filtration* mungkin diperlukan untuk menghilangkan partikel koloid contoh tertentu seperti Mn atau Fe oksida atau koloid lainnya. Gunakan kaca, TFE atau *stainless steel* untuk menahan filter yang dipilih

3.2.3.2.3 Pereaksi

- Air bebas organik: Air suling (*reagent water*) golongan I atau air yang setara. Gunakan untuk seluruh pembuatan standar dan cara kerja lain.
- Kalium kloroplatinat, K_2PtCl_6 , pa
- Kobalt klorida, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, pa
- Natrium klorida, HCl, pa
- Natrium hidroksida, NaOH, pa

3.2.3.2.4 Pembuatan larutan standar

Larutkan 1,246 g kalium kloroplatinat, K_2PtCl_6 dan 1,00 g kristal kobalt klorida, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ dalam air suling dengan 100 mL HCl pekat, encerkan menjadi 1 000 mL dengan air suling. Larutan stok ini memiliki warna 500 unit warna. Standar 500 unit warna juga tersedia secara komersial dan cocok digunakan sebagai standar primer.

Buat standar yang memiliki 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, dan 100 unit warna dengan dengan mengencerkan 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL; 6,0 mL; 8,0 mL; 10,0 mL; dan 20,0 mL stok standar warna dengan air suling dalam labu ukur 100 mL. Lindungi standar terhadap penguapan dan kontaminasi ketika tidak digunakan. Simpan dalam gelap ketika tidak digunakan, dan simpan hanya untuk 1 bulan.

3.2.3.2.5 Kurva standar spektrofotometrik

Biarkan spektrofotometer hangat hangat sesuai dengan instruksi pabrik. Pilih panjang gelombang antara 450 nm dan 465 nm untuk membuat kurva standar; pilihan yang baik adalah 456 nm. Serapan dari Pt-Co mempunyai serapan maksimum yang lebar dalam kisaran panjang gelombang ini. Gunakan sel spektrofotometer yang sesuai. Isi satu sel dengan air untuk menjadikan alat nol. Baca serapan untuk masing-masing standar warna dan buat kurva standar dari unit warna terhadap serapan. kurva warna yang sudah diprogram sudah tersedia padabeberapa spektrofotometer. Kurva dapat diperiksa dengan menggunakan standar yang dibuat pada 3.2.3.2.4.

3.2.3.2.6 Persiapan contoh

Jika warna sebenarnya yang akan diukur, bersihkan penyaring membran dan alat penyaring dengan melewatkan sedikitnya 50 mL air suling melalui saringan. Saring sekitar 25 mL contoh dan buang filtrat. Selanjutnya saring sekitar 50 mL contoh melalui saringan yang sama dan simpan untuk analisis. Senantiasa/selalu menyaring contoh.

3.2.3.2.7 Cara kerja

Biarkan spektrofotometer hangat hangat sesuai dengan instruksi pabrik. Atur panjang gelombang pada penyetelan yang sama seperti digunakan untuk membuat kurva standar; pastikan bahwa jarak lintasan sel adalah sama seperti yang digunakan untuk kurva standar. Isi satu sel dengan air untuk menjadikan alat nol. Bilas sel yang lain dengan contoh dan kemudian isi kembali. Tempatkan sel dalam spektrofotometer dan baca serapan. Ulangi untuk contoh yang tersisa.

3.2.3.2.8 Perhitungan

Tentukan warna contoh menggunakan bacaan serapan dan kurva standar yang berhubungan dengan serapan dan unit warna. Untuk spektrofotometer dengan kurva kalibrasi untuk warna yang sudah diprogram, nol kan alat dan lakukan pengukuran contoh sesuai dengan instruksi alat.

3.3 pH

3.3.1 Prinsip

Metode pengukuran pH secara elektrometri berdasarkan pengukuran aktivitas ion hidrogen dengan menggunakan metode pengukuran secara potentiometri dengan elektrode gelas

hidrogen sebagai standar primer dan elektrode kalomel atom perak klorida sebagai pembanding.

3.3.2 Peralatan

- pH meter;
- Elektroda gelas;
- Elektroda pembanding;
- Pengaduk magnetik;
- Gelas piala 250 mL.

3.3.3 Pereaksi

- Larutan standar pH;
 - Larutan bufer 4
 - Larutan bufer 7
 - Larutan bufer 9
- Air suling.

3.3.4 Cara kerja

- b) Kalibrasikan alat dengan larutan bufer setiap kali akan melakukan pengukuran;
- c) Pengukuran contoh: celupkan elektroda yang telah dibersihkan dengan air suling ke dalam contoh yang akan diukur pH-nya. Catat dan baca nilai pH.

3.4 Kekeruhan

3.4.1 Prinsip

Metode ini didasarkan atas perbandingan intensitas cahaya yang tersebar oleh contoh dalam kondisi yang ditetapkan dengan intensitas cahaya yang tersebar oleh suspensi standar acuan dalam kondisi yang sama. Pada intensitas yang lebih tinggi dari cahaya tersebar, semakin tinggi kekeruhan. Polimer formazin digunakan sebagai suspensi standar acuan primer. Kekeruhan dengan konsentrasi tertentu dari suspensi formazin didefinisikan sebagai 4 000 NTU.

3.4.2 Peralatan

- Turbidimeter (nefelometer);
- Tabung nefelometer;
- Labu ukur 100 mL, terkalibrasi;
- Neraca analitik, terkalibrasi;
- Pipet 5 mL dan 10 mL terkalibrasi.

3.4.3 Pereaksi

- air pengenceran: air dengan kemurnian tinggi yang akan menyebabkan penyebaran cahaya, yang dideteksi oleh nefelometer sebagai kekeruhan. Untuk mendapat air untuk pengenceran dengan kekeruhan rendah, nilai 0,02 NTU, lewatkan air laboratorium bermutu pereaksi melalui penyaring dengan ukuran pori cukup kecil untuk menghilangkan semua partikel yang lebih besar dari 0,1 μm ; membran penyaring yang biasanya digunakan untuk pemeriksaan bakteriologis tidaklah memuaskan.
- Suspensi stok standar primer formazin

SNI 3554:2015

- Larutan I:

Larutan baku kekeruhan

Larutkan 1,000 g hidrazin sulfat $(\text{NH}_2)_2 \text{H}_2\text{SO}_4$ dalam air, kemudian encerkan sampai 100 mL dalam labu ukur.

PERINGATAN hidrazin sulfat merupakan karsinogen; hindari terhisap, tertelan, dan kontak dengan kulit. Suspensi formazin dapat mengandung residu hidrazin sulfat

- Larutan II:

Larutkan 10,00 g heksametilen tetramin $(\text{CH}_2)_6\text{N}_4$ di dalam air suling, kemudian encerkan sampai 100 mL dalam labu ukur.

- Larutan standar primer 4 000 NTU:

Campurkan 5,0 mL larutan I dengan 5,0 mL larutan II kedalam erlenmeyer. Biarkan selama 24 jam pada suhu $(25 \pm 3)^\circ\text{C}$. Hasil larutan ini adalah suspensi 4 000 NTU.

Untuk penyimpanan, pindahkan suspensi stok ke botol gelas berwarna kuning sawo atau botol lainnya yang dapat menahan sinar UV. Buat pengenceran dari suspensi stok ini. Suspensi stok stabil sampai 1 tahun ketika disimpan dengan benar

- Suspensi kekeruhan:

Encerkan suspensi standar encer kekeruhan primer 4 000 NTU dengan air bebas kekeruhan. Suspensi ini pada waktu dipakai dalam keadaan segar dan buang setelah dipakai.

- Standar sekunder adalah standar buatan manufaktur atau organisasi pengujian independen yang telah bersertifikat yang akan memberikan hasil kalibrasi instrumen yang sama dengan hasil kalibrasi instrumen yang dikalibrasi dengan standar primer seperti formazin yang disiapkan oleh analis (definisi).

3.4.4 Cara kerja

a) Kalibrasi alat;

Kalibrasi alat nefelometer dengan beberapa standar kekeruhan.

b) Kocok contoh dengan sempurna, diamkan sampai gelembung udara hilang, kemudian tuangkan contoh ke dalam tabung nefelometer;

c) Baca nilai kekeruhan pada skala alat tersebut. Untuk contoh yang derajat kekeruhan > 40 NTU, maka cuplikan diencerkan dengan air bebas kekeruhan sampai mencapai kekeruhan 30 NTU - 40 NTU.

3.4.5 Pelaporan hasil

Tabel 2 - Pelaporan hasil pembacaan

| No. | Jarak kekeruhan NTU | Pelaporan paling mendekati NTU |
|-----|---------------------|--------------------------------|
| 1 | 0 - 1,0 | 0,05 |
| 2 | 1 - 10 | 0,1 |
| 3 | 10 - 40 | 1 |
| 4 | 40 -100 | 5 |
| 5 | 100 - 400 | 10 |
| 6 | 400 - 1 000 | 50 |
| 7 | > 1 000 | 100 |

3.5 Zat yang terlarut¹

3.5.1 Prinsip

Contoh yang telah dihomogenkan dengan baik disaring melalui penyaring serat kaca standar, filtrat kemudian diuapkan hingga mendekati kering menggunakan pinggan penguap berbobot kosong dan dikeringkan hingga tercapai bobot tetap pada suhu 180 °C. Penambahan bobot pinggan mewakili zat padat terlarut total. Cara kerja ini dapat digunakan untuk pengeringan pada temperatur lainnya.

Hasil yang diperoleh dapat tidak sesuai dengan nilai teoretis zat padat terlarut total yang dihitung dari hasil-hasil pengujian kimia analitik lainnya dari contoh. Metode pendekatan untuk dapat mengkorelasikan hasil-hasil pengujian lainnya dengan zat padat terlarut total tersedia.

3.5.2 Gangguan-gangguan

Sampling, Sub-Sampling, dan pemipetan dengan dua atau tiga tahapan terhadap contoh dapat mengakibatkan kesalahan serius. Buat dan pertahankan contoh tetap homogen ketika ditransfer. Gunakan penanganan khusus untuk menjamin keutuhan contoh ketika melakukan sub-sampling. Campurkan sejumlah porsi kecil contoh dengan *magnetic stirrer*. Jika terdapat padatan tersuspensi, pipet menggunakan pipet berlubang besar. Pertimbangkan bagian dari contoh yang tertinggal pada kemasan pada saat mengevaluasi dan melaporkan hasil uji. Beberapa contoh mengering dengan membentuk lapisan kerak yang menghalangi penguapan air, penanganan khusus dibutuhkan guna menghadapinya. Hindari menggunakan *magnetic stirrer* untuk contoh yang mengandung partikel bermagnet.

Temperatur pengeringan residu berpengaruh terhadap hasil dikarenakan kehilangan bobot akibat penguapan bahan organik yang secara mekanik teroklusi oleh air, air kristal, dan gas-gas dari dekomposisi bahan kimia yang terkena panas, sebagaimana halnya penambahan bobot akibat oksidasi, tergantung pada temperatur dan lamanya pemanasan. Tiap contoh membutuhkan perhatian dalam hal desikasi setelah pengeringan. Minimalkan membuka desikator karena dapat menyebabkan masuknya kelembapan. Beberapa contoh dapat bersifat desikan yang lebih kuat daripada yang digunakan dalam desikator dan dapat menyerap air.

Residu yang dikeringkan pada 103 °C hingga 105 °C dapat mempertahankan tidak hanya air kristal, namun juga bahan yang teroklusi oleh air secara mekanik. Hilangnya CO₂ dapat mengakibatkan perubahan bikarbonat menjadi karbonat. Hilangnya bahan organik oleh penguapan biasanya dalam jumlah yang sangat sedikit. Karena penghilangan bahan yang teroklusi secara mekanik oleh air pada temperatur ini sedikit, perolehan bobot tetap dapat menjadi sangat lambat.

Residu yang dikeringkan pada (180 ± 2) °C akan kehilangan hampir semua bahan yang teroklusi oleh air. Beberapa air kristal dapat bertahan, terutama jika terdapat sulfat. Bahan organik dapat hilang oleh penguapan, namun tidak sepenuhnya rusak. Hilangnya CO₂ dapat mengakibatkan perubahan bikarbonat menjadi karbonat, dan karbonat dapat terdekomposisi sebagian menjadi oksida atau garam-garam dasar. Beberapa garam klorida dan nitrat dapat hilang. Secara umum, penguapan dan pengeringan air pada 180 °C menghasilkan nilai padatan terlarut total yang lebih dekat dengan hasil yang didapat melalui penjumlahan kadar beberapa spesies mineral yang diuji secara terpisah, daripada nilai padatan terlarut total yang menggunakan temperatur pengeringan lebih rendah.

¹ yang dimaksud zat yang terlarut adalah Zat Padat Terlarut Total Dikeringkan pada 180 °C sesuai APHA Total Dissolved Solids Dried at 180°C

Gunakan air tipe III untuk membilas filter dan padatan tersaring, dan untuk membersihkan peralatan laboratorium. Contoh-contoh khusus dapat membutuhkan air dengan tingkat kemurnian yang lebih tinggi.

Hasil untuk residu yang mengandung banyak minyak dan lemak dapat dipertanyakan karena kesulitan untuk pengeringan hingga bobot tetap dalam waktu yang rasional.

Guna jaminan mutu, lakukan pengujian secara duplikat. Keringkan contoh hingga bobot tetap jika memungkinkan. Hal tersebut memerlukan banyak pengulangan siklus pengeringan – pendinginan – penimbangan untuk tiap pengujian.

Analisis yang dilakukan untuk tujuan khusus dapat menyimpang dari prosedur yang telah ditetapkan untuk mengakomodir konstituen yang tidak biasa dalam padatan terukur. Kapanpun variasi teknis digunakan, catat dan cantumkan hal tersebut bersama hasil uji.

Air bermineral tinggi dengan kandungan kalsium, magnesium, klorida, dan atau sulfat yang relatif besar dapat bersifat higroskopis dan memerlukan waktu pengeringan yang lebih lama, cara desikasi yang sesuai, dan penimbangan cepat. Contoh-contoh yang memiliki kandungan karbonat tinggi memerlukan pengeringan pada suhu 180 °C secara hati-hati dalam waktu yang lebih lama untuk menjamin perubahan sempurna bikarbonat menjadi karbonat. Residu bikarbonat yang berlebih dalam pinggan dapat membentuk kerak yang memerangkap air, batasi contoh hingga menghasilkan tidak lebih dari 200 mg residu.

3.5.3 Quality Control (QC)

Cara-cara QC yang baik dan benar yang dianggap sebagai bagian tak terpisahkan dari setiap metode terangkum pada tabel berikut:

| Pengujian | Bias | Presisi | LDM ¹ | Rentang Operasional |
|-----------|------|---------|------------------|---------------------|
| Padatan | - | * | - | - |

¹ Limit Deteksi Metode

| Pengujian | Kalibrasi atau Standardisasi | QCS ¹ | MB ² | LFB ³ | Duplikat | LFM ⁴ |
|-----------|------------------------------|------------------|-----------------|------------------|----------|------------------|
| Padatan | - | - | * | - | * | - |

¹ *Quality Control Sample*

² *Method Blank*

³ *Laboratory Fortified Blank*

⁴ *Laboratory Fortified Material*

3.5.4 Peralatan

- Pinggan penguap: pinggan dengan kapasitas 100mL yang terbuat dari salah satu material berikut:
 - Porselin, diameter 90 mm.
 - Platina – Umumnya memuaskan untuk semua tujuan.
 - Gelas tinggi silika.
- Tanur, untuk dioperasikan pada 550 °C.
- Penangas air.
- Desikator, disediakan dengan desikan yang mengandung indikator warna terhadap tingkat kelembapan atau sebuah indikator instrumental.
- Neraca analitik, dapat menimbang hingga 0,1 mg.
- Magnetic stirrer*, dengan batang pengaduk TFE.
- Pipet berlubang besar.
- Gelas ukur.
- Piala gelas pendek.
- Piringan penyaring serat kaca tanpa pengikat organik.

- k. Peralatan penyaring: Salah satu dari daftar berikut sesuai untuk piringan penyaring kaca terpilih:
 1. Corong penyaring membran.
 2. Cawan Gooch, kapasitas 25 mL hingga 40 mL, dengan adapter cawan Gooch.
 3. Peralatan penyaring dengan penampung dan piringan berpori kasar (40 hingga 60 μm) sebagai penyangga saringan.
- l. Labu pengisap, kapasitas disesuaikan dengan volume contoh yang digunakan.
- m. Oven pengering, untuk dioperasikan pada 180 ± 2 °C.

3.5.5 Cara Kerja

- a. Persiapan piringan penyaring serat kaca:

Jika menggunakan piringan penyaring serat kaca yang telah disiapkan sebelumnya, hilangkan langkah ini. Masukkan piringan dengan sisi berkerut menghadap ke atas peralatan penyaring. Operasikan pompa vakum dan cuci piringan dengan tiga kali berturut-turut 20 mL air tingkat kemurnian pereaksi. Lanjutkan pengisapan vakum untuk menghilangkan sisa air. Buang air pencuci.
- b. Persiapan pinggan penguap:

Jika kadar padatan yang mudah menguap juga akan diuji, pijarkan pinggan penguap pada 550 °C selama 1 jam di dalam tanur. Jika hanya menguji kadar zat padat terlarut total, panaskan pinggan penguap pada (180 ± 2) °C selama 1 jam dalam oven. Simpan dalam desikator hingga saatnya dibutuhkan. Timbang segera sebelum digunakan.
- c. Pemilihan penyaring dan ukuran contoh:

Pilih volume contoh sehingga menghasilkan residu kering 2,5 mg sampai 250 mg. Jika lebih dari 10 menit waktu yang dibutuhkan untuk menyaring, tingkatkan ukuran penyaring atau kurangi volume contoh.
- d. Pengujian contoh:

Aduk contoh menggunakan *magnetic stirrer* dan pipet sejumlah volume terukur ke dalam penyaring serat kaca yang telah terhubung dengan pompa vakum yang menyala. Cuci dengan tiga kali berturut-turut 10 mL air tingkat kemurnian pereaksi, biarkan tersedot hingga habis antara pencucian, dan lanjutkan pengisapan vakum selama kira-kira 3 menit setelah penyaringan selesai. Pindahkan filtrat total (ditambah air pencuci) ke dalam pinggan penguap yang telah ditimbang bobot kosongnya dan uapkan hingga kering menggunakan pemanasan uap air atau oven pengering. Jika dibutuhkan, pengeringan dapat dilakukan bertahap dengan membagi porsi filtrat menjadi beberapa kali ke dalam pinggan penguap yang sama setelah setiap pengeringan. Keringkan contoh yang diuapkan setidaknya selama 1 jam pada (180 ± 2) °C, dinginkan dalam desikator hingga suhu ruang, dan timbang. Ulangi siklus pengeringan, pendinginan, desikasi, dan penimbangan hingga tercapai bobot tetap atau hingga selisih penimbangan dengan sebelumnya tidak lebih dari 4% atau 0.5 mg, yang mana yang lebih kecil. Lakukan pengulangan pengujian duplo setidaknya sebanyak 10% dari keseluruhan contoh. Pengulangan pengujian contoh tidak boleh berbeda lebih dari 5% terhadap bobot residu rata-ratanya.

3.5.6 Perhitungan

$$\text{Zat pada terlarut total (mg/L)} = \frac{(A-B) \times 1\,000}{\text{volume contoh (mL)}}$$

Keterangan:

A = bobot residu kering + pinggan penguap, mg.

B = bobot piringan penguap kosong, mg.

3.5.7 Presisi

Pengujian laboratorium tunggal terhadap 77 contoh yang diketahui memiliki kadar 293 mg/L telah dilakukan dengan simpangan baku sebesar 21,20 mg/L.

3.6 Zat organik (angka KMnO_4)

3.6.1 Penentuan angka permanganat

3.6.1.1 Pengertian

Angka permanganat (dari air): konsentrasi massa dari oksigen yang setara terhadap jumlah penggunaan ion permanganat ketika suatu sampel air diperlakukan dengan oksidan tersebut dengan kondisi tertentu.

3.6.1.2 Prinsip

Pemanasan sampel dalam penangas air dengan jumlah potasium permanganat dan asam sulfat yang diketahui pada periode waktu yang ditentukan (10 min). Reduksi sebagian permanganat oleh bahan pengoksidasi di dalam sampel dan penentuan penggunaan permanganat dengan penambahan larutan oksalat berlebih, diikuti dengan titrasi dengan permanganat.

CATATAN 1 angka permanganat yang disarankan setara dengan penggunaan sekitar 60% dari penambahan permanganat pada sampel yang tidak diencerkan.

3.6.1.3 Pereaksi

Saat analisis berlangsung, hanya pereaksi yang telah diakui pada tingkat analisis yang digunakan dan air destilata, air RO atau air yang dimurnikan. Jangan menggunakan air deionisasi dari penukar ion organik.

CATATAN 2 air tak mereduksi dapat dipersiapkan seperti berikut. Tambahkan 10 mL asam sulfat dan larutan stok kalium permanganat sedikit berlebih, dan tambahkan air suling hingga 1 liter. Distilasi dalam halat kaca dan buang 100 mL destilat pertama. Simpan di dalam botol kaca dengan penutup atau pengganjal kaca.

Volume penggunaan larutan standar potasium permanganat V_0 (lihat 3.6.1.6.4) tidak akan lebih dari 0.1 mL, jika tidak prosedur akan diulang atau gunakan air dengan kandungan organik yang rendah.

3.6.1.3.1 Asam sulfat, $\rho(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1,84 \text{ g/mL}$, 18 mol/L

3.6.1.3.2 Asam sulfat, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 7,5 \text{ mol/L}$

Tambahkan secara perlahan, sambil diaduk secara kontinu, 420 mL asam sulfat ke dalam 500 mL air. Biarkan hingga dingin dan diencerkan hingga 1 liter.

3.6.1.3.3 Asam sulfat, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2 \text{ mol/L}$

Tambahkan secara perlahan, sambil diaduk, 110 mL asam sulfat kedalam 500 mL air. Secara perlahan tambahkan larutan potasium permanganat hingga berwarna merah mudah

seulas. Biarkan sampai dingin, encerkan dengan air hingga 1 liter lalu dikocok/dihomogenkan.

3.6.1.3.4 Natrium oksalat, larutan stok, $c(\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4) = 0,05 \text{ mol/L}$.

Keringkan natrium oksalat pada 120°C selama 2 jam. Larutkan 6,700 g padatan yang telah dikeringkan dengan air dalam labu ukur 1 000 mL. Tera dengan air lalu di homogenkan. Larutan ini stabil hingga 6 bulan jika disimpan di tempat gelap.

3.6.1.3.5 Natrium oksalat, larutan standar, $c(\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4) = 5 \text{ mmol/L}$.

Pipet $(100 \pm 0,25) \text{ mL}$ larutan stok natrium oksalat (3.6.1.3.4) ke dalam labu ukur 1 000 mL. Tera dengan air dan homogenkan.

Standar ini stabil selama 2 minggu.

CATATAN 3 larutan komersial dapat digunakan.

3.6.1.3.6 Potasium permanganat, larutan stok, $c(\text{KMnO}_4) \approx 20 \text{ mmol/L}$.

Larutkan kira-kira 3,2 g potasium permanganat dalam air dan tera hingga 1 000 mL. Panaskan larutan tersebut pada 90°C hingga 95°C selama 2 jam, dinginkan dan simpan selama kurang dari 2 hari. Tuang larutan jernihnya dan simpan dalam botol kaca yang gelap.

3.6.1.3.7 Potasium permanganat, larutan ukur, $c(\text{KMnO}_4) \approx 2 \text{ mmol/L}$.

Pipet 100 mL larutan stok potasium permanganat (5.4) ke dalam labu ukur 1 000 mL. Tera dengan air dan dihomogenkan.

Larutan ukur ini relatif stabil selama beberapa bulan jika disimpan di tempat gelap. Prosedur yang diuraikan pada 3.6.1.6.5 secara otomatis diperbolehkan untuk konsentrasi yang tepat untuk dimasukkan ke perhitungan 3.6.1.7.1.

3.6.1.4 Alat

Peralatan laboratorium yang biasanya digunakan, dan yang berikut ini yang harus digunakan.

3.6.1.4.1 Penanggas air, dengan sebuah penyangga untuk tabung reaksi, dengan kapasitas yang sesuai dan kekuatan yang menjamin bahwa larutan dalam tabung reaksi mudah dijangkau dan suhunya dapat dipertahankan antara 96°C dan 98°C , selama kedua pemanasan awal dan tahapan reaksi.

3.6.1.4.2 Tabung uji, dengan panjang 150 mm hingga 200 mm, diameter 25 mm hingga 35 mm dan ketebalan dinding 0.5 mm hingga 1 mm. Simpan tabung uji tersebut secara terpisah selama penentuan indeks permanganat.

Bersihkan semua tabung reaksi yang baru dengan pemanasan menggunakan larutan permanganat yang diasamkan. Ini akan dikontrol oleh penentuan blangko hingga nilainya cukup kecil dan konstan.

Nilai suatu blangko V_0 biasanya tidak lebih dari 0.1 mL.

3.6.1.4.3 Buret, dengan kapasitas 10 mL, sebaiknya digunakan tipe piston, berskala dengan resolusi 0,02 mL, dan disesuaikan dengan kebutuhan dari ISO 358-1.

3.6.1.4.4 Labu ukur, dengan kapasitas 100 mL dan 1 000 mL.

3.6.1.4.5 Pipet volumetri, dengan kapasitas 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL, dan 100 mL.

3.6.1.5 Sampling dan sampel

Dengan segera setelah sampel diterima di laboratorium, tambahkan asam sulfat (3.6.1.3.2) pada setiap liter sampel, jika ini tidak dilakukan selama sampling di lapangan, bagaimanapun juga sampel harus disimpan sebelum dianalisis.

Analisis sampel dilakukan secepatnya dan tidak boleh lebih dari 2 hari setelah dilakukan sampling. Sampel disimpan di tempat gelap pada suhu 0 °C hingga 5 °C jika waktu penyimpanan lebih dari 6 hari.

Kocok botol penyimpanan dan pastikan seluruh komponen homogen ketika ada bagian dari analisis yang diundur.

3.6.1.6 Prosedur

3.6.1.6.1 periksa semua labu dan tabung reaksi (3.6.1.4.2) yang digunakan selama prosedur, agar benar-benar bersih (3.6.1.4.1).

3.6.1.6.2 Encerkan sampel yang mengandung indeks permanganat yang tinggi, sehingga hasil pengenceran sampel berada pada kisaran 0,5 mg/L hingga 10 mg/L.

3.6.1.6.3 Pipet 25,0 mL \pm 0,25 mL sampel uji (atau sampel uji yang diencerkan) ke dalam tabung uji. Tambahkan 5 mL \pm 0,5 mL asam sulfat (3.6.1.3.3) dan campurkan dengan putaran secara perlahan.

Tempatkan tabung uji tersebut ke dalam penangas air (3.6.1.4.1) selama 10 menit \pm 2 menit.

Tambahkan 5 mL \pm 0,05 mL larutan ukur potasium permanganat (3.6.1.3.7) dan perhitungan waktu dimulai.

Setelah 10 menit \pm 15 detik, tambahkan 5 mL \pm 0,05 mL larutan ukur standar natrium oksalat (3.6.1.3.5) dan tunggu hingga larutan tidak berwarna. Titrasi, sambil dipanaskan, dengan larutan ukur potasium permanganat (3.6.1.3.7) hingga berwarna merah muda seulas yang bertahan kira-kira 30 detik. Catat volume V_1 larutan permanganat yang digunakan.

3.6.1.6.4 Lakukan hal yang sama pada blangko, menggunakan prosedur yang sama, tetapi gantikan bagian yang diuji dengan 25 mL air. Catat volume V_0 larutan permanganat yang digunakan.

Simpan larutan yang dititrasi untuk standardisasi larutan ukur potasium permanganat yang diuraikan pada 3.6.1.6.5.

3.6.1.6.5 Kedalam larutan blangko yang dititrasi, yang disimpan pada uji (3.6.1.6.4), tambahkan 5,00 mL \pm 0,005 mL larutan ukur standar (3.6.1.3.5). Panaskan kembali larutan tersebut, jika diperlukan, pada 80 °C dan dititrasi dengan larutan ukur potasium permanganat (3.6.1.3.7) hingga muncul warna merah muda seulas yang bertahan kira-kira 30 detik. Catat volume V_2 dari larutan permanganat yang digunakan.

CATATAN 4 adalah suatu hal yang baik jika larutan yang dititrasi disimpan dalam tabung uji saat diperlukan untuk penentuan indeks permanganat selanjutnya.

3.6.1.7 Penyampaian hasil

3.6.1.7.1 Perhitungan

Hitung indeks permanganat, I_{Mn} , nyatakan dalam miligram oksigen/L, menggunakan:

$$I_{Mn} = \frac{V_1 - V_0}{V_2} \times f$$

Dimana

V_0 volume, dalam mililiter, dari larutan permanganat yang digunakan pada titrasi blangko (3.6.1.6.4);

V_1 volume, dalam mililiter, dari larutan permanganat yang digunakan pada titrasi sampel uji (3.6.1.6.3);

V_2 volume, dalam mililiter, dari larutan permanganat yang digunakan pada titrasi standarsisasi (3.6.1.6.5);

f adalah faktor, dalam miligram/L, untuk perhitungan kembali oksigen dan volume sampel yang digunakan; f dihitung seperti berikut:

$$f = \frac{V_4 \times c(\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4) \times M_O \times 1\,000}{1\,000 \times V_5}$$

dimana

V_4 volume, dalam mililiter, dari larutan standar ukur natrium oksalat (3.6.1.3.5) yang digunakan pada penentuan 3.6.1.6.5 ;

$c(\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4)$ jumlah(konsentrasi), dalam milimol/L, dari larutan standar ukur (3.6.1.3.5);

1 000(pembilang) faktor untuk perhitungan kembali dari $c(\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4)$, dari mmol/L ke mmol/mL, dalam mililiter/Liter;

M_O massa molar, dalam miligramoksigen/milimol, untuk perhitungan kembali oksigen;

V_5 volume sampel yang digunakan, dalam mililiter;

1 000(penyebut) faktor untuk perhitungan kembali dari pengukuran nilai untuk 1liter dari volume sampel, dalam mililiter/Liter

3.6.1.7.2 Ketepatan

3.6.1.7.2.1 Standar dalam laboratorium

| Sampel | Indeks permanganat yang diperoleh (mg/L) | Standar deviasi(mg/L) | Derajat kebebasan |
|---|--|-----------------------|----------------------|
| Air kran ¹⁾ | 1,28 – 1,94 | 0,06 – 0,21 | 10 |
| <i>Resorcinol</i> ²⁾ (1,0 mg/L) | 1,63 – 2,04 | 0,06 – 0,20 | 10 |
| <i>Resorcinol</i> ²⁾ (6,0 mg/L) | 9,32 – 10,28 | 0,07 – 0,27 | 10 |
| Berbagai jenis air baku dan air minum ³⁾ | 0,23 – 8,17 | 0,05 – 0,60 | Bervariasi diatas 10 |

¹⁾ kisaran nilai yang diperoleh dari pengujian air kran pada 6 laboratorium. N.B. kisaran nilai yang diperoleh tidak dapat digunakan untuk mengindikasikan keberadaan dari bias laboratorium, karena kemungkinan ketidakstabilan dari sampel.

²⁾ kisaran nilai yang diperoleh oleh 7 laboratorium untuk larutan *resorcinol*, terbuat dari laboratorium tunggal, dari contoh *resorsinol* yang didistribusikan.

³⁾ kisaran simpangan baku dari berbagai air baku dan air minum, data diperoleh dari 5 laboratorium.

3.6.1.7.2.2 standar deviasi

| Sampel | Indeks permanganat yang diperoleh (mg/L) | Standar deviasi (mg/L) | Derajat kebebasan |
|--|--|------------------------|-------------------|
| <i>Resolcinol</i> ¹⁾ (1,0 mg/L) | 1,83 | 0,1 | 20 |
| <i>Resolcinol</i> ¹⁾ (6,0 mg/L) | 9,95 | 0,12 | 23 |

¹⁾ total standar deviasi diperoleh oleh laboratorium tunggal oleh beberapa bets.

3.6.1.8 Laporan hasil uji

Hasil uji akan menyertakan beberapa informasi berikut:

- referensi pada standar ini
- ketepatan identifikasi sampel
- beberapa praperlakuan, seperti filtrasi atau sedimentasi, yang mungkin mempengaruhi hasil
- hasilnya, hingga dua angka penting dan dinyatakan dalam miligram per liter
- setiap perbedaan dari prosedur spesifik, setiap pengerjaan yang dianggap sebagai pilihan, atau beberapa kondisi lain yang dapat mempengaruhi hasil.

3.6.2 Metode spektrofotometri

3.6.2.1 Prinsip

Kandungan kalium permanganat yang berwarna merah, langsung ditetapkan berdasarkan pengukuran absorben pada panjang gelombang 525 nm.

3.6.2.2 Peralatan

- Spektrofotometer pada panjang gelombang 525 nm dengan lebar celah 1 cm atau lebih, terkalibrasi;
- Alat penyaring, millipore atau sejenis yang berpori 0,22 μm tidak bereaksi dengan KMnO_4 ;
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg, terkalibrasi;
- Labu ukur 100 mL dan 1 000 mL, terkalibrasi.

3.6.2.3 Pereaksi

- Larutan kalsium klorida, CaCl_2 1 M;
Larutkan 111 g CaCl_2 dengan air bebas KMnO_4 dalam labu ukur 1 000 mL, tepatkan sampai tanda garis.
- Asam sulfat H_2SO_4 20 %;
Tambahkan pelan-pelan 20 g H_2SO_4 ke dalam 80 mL air bebas KMnO_4 , setelah dingin tepatkan volumenya sampai 100 mL.
- Larutan natrium tiosulfat, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,019 M;
Larutkan 0,471 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dengan air suling bebas KMnO_4 dalam labu ukur 100 mL tepatkan sampai tanda garis.
- Natrium oksalat $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, standar primer;
- Air suling bebas KMnO_4 ;
Tambahkan sedikit kristal KMnO_4 ke dalam 1 000 mL air suling, biarkan 1 hari sampai 2 hari. Distilasi kembali air tersebut, buang 50 mL hasil distilasi pertama. Tampung hasil distilasi, uji dengan penunjuk DPD, bila berwarna merah menunjukkan bebas KMnO_4 ;
- Penunjuk DPD (N,N- dietil- phenylenediamine);
Larutkan 1 g DPD sulfat atau 1,5 g DPD sulfat pentahidrat atau 1,1 g DPD sulfat anhidrat dalam air suling bebas klorin yang mengandung 8 mL H_2SO_4 1:3 jadikan 100 mL.
- Standar KMnO_4 0,006 M;
Larutkan 1,000 g KMnO_4 dalam air, tepatkan sampai 1 000 mL. Standardisasi larutan KMnO_4 dengan cara:

Timbang dengan teliti kira-kira 0,1 g standar $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ primer dan larutkan dengan 150 mL air suling bebas KMnO_4 dalam erlenmeyer 250 mL. Tambahkan 20 mL H_2SO_4 20 % dan panaskan sampai 80 °C Titrasi larutan oksalat panas tersebut dengan standar KMnO_4 sampai berwarna merah jambu (warna stabil selama 60 detik)

Konsentrasi standar KMnO_4 dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{mg KMnO}_4/\text{L} = \frac{W \times 1\,000}{2,119\,7 \times V}$$

keterangan:

W adalah berat $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (mg);

V adalah volume KMnO_4 (mL).

3.6.2.4 Cara kerja

- Siapkan larutan standar kalibrasi dengan mengencerkan larutan standar KMnO_4 dengan konsentrasi 0,25 mg/L sampai 1,5 mg/L;
- Nolkan spektrofotometer pada panjang gelombang 525 nm dengan air suling bebas KMnO_4 ;
- Jika contoh merupakan air lunak (contoh mengandung kesadahan $\text{CaCO}_3 < 40$ mg/L, tambahkan 1 mL CaCl_2 untuk 1 L contoh dan jika contoh mengandung suspensi saring contoh dengan kertas saring berpori 0,22 μm dan periksa contoh dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 525 nm (pembacaan A) ;
- Ke dalam 100 mL contoh tambahkan 0,1 mL CaCl_2 dan 0,1 mL larutan natrium tio sulfat per 1 mg KMnO_4 berdasarkan (pembacaan A) ;
- Kerjakan larutan standar kalibrasi dan blanko seperti cara kerja bagian c. Periksa larutan standar kalibrasi, blanko dan contoh dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 525 nm.

3.6.2.5 Perhitungan

- Koreksi Absorben = Absorben contoh – Absorben blanko.
- Hitung konsentrasi kalium permanganat dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi dalam mg KMnO_4/L .

3.7 Total organik karbon

3.7.1 Prinsip

Karbon organik dioksidasi menjadi karbon dioksida (CO_2) oleh persulfat dengan adanya sinar ultraviolet, CO_2 yang dihasilkan diukur secara langsung dengan alat inframerah nondispersi, direduksi menjadi metana dan diukur dengan detektor nyala ion pembakaran (*flame ionization detector*).

3.7.2 Peralatan

- Alat analisis total organik karbon ;
- Penyuntik mikro 0 μL – 50 μL , 0 μL – 250 μL , 0 μL – 1 mL ;
- Labu ukur 1 000 mL terkalibrasi ;
- Neraca analitik terkalibrasi ;
- Gelas ukur 100 mL.

3.7.3 Pereaksi

- Air untuk Pereaksi;
- Air yang digunakan untuk pereaksi, blanko dan larutan standar yaitu air yang mengandung TOC lebih kecil dari harga 2 x LDM (limit deteksi metoda).

Penetapan LDM sebagai berikut:

- Tambahkan kandungan analit ke dalam air untuk pereaksi dengan konsentrasi mendekati perkiraan LDM.
- Tetapkan kandungan analitnya dengan mengikuti seluruh tahapan metode uji
- Lakukan pengulangan sebaiknya minimal sebanyak 7 kali.
- Hitunglah standar deviasinya dari pengulangan pengulangan tersebut.

- Asam fosfat (H_3PO_4) atau asam sulfat (H_2SO_4);
- Larutan baku karbon organik;
 - Larutkan 2,125 4 g kalium biftalat anhidrat pa ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$) dengan air bebas karbon dalam labu ukur 1 000 mL sampai tepat tanda tera.
 - 1,0 mL = 1,00 mg karbon
 - Atau dapat menggunakan senyawa lain yang mempunyai kemurnian dan kestabilan yang cukup serta larut dalam air. Awetkan dengan menambahkan asam fosfat atau asam sulfat sampai $\text{pH} \leq 2$ dan simpan pada 4 °C.
- Larutan baku karbon anorganik;
 - Larutkan 4,412 2 g natrium karbonat (Na_2CO_3) anhidrat dengan air untuk pereaksi dalam labu ukur 1 000 mL, dan
 - Tambahkan 3,497 g natrium bikarbonat (NaHCO_3) encerkan sampai tepat tanda tera 1,0 mL = 1,00 mg karbon. Senyawa karbonat mempunyai kemurnian dan kestabilan yang cukup serta larut dalam air. Simpan dengan tutup yang rapat. Jangan diasamkan
- Gas pembawa;

Oksigen murni atau udara bebas CO_2 dan mengandung hidrokarbon (metana) kurang dari 1 ppm
- Gas pencuci;

Gas apa saja yang bebas dari CO_2 dan hidrokarbon.
- Larutan natrium peroksidisulfat 10 %;

Larutkan 100 g natrium peroksidisulfat dalam air jadikan volumenya menjadi 1 L.
- Larutan amonium peroksidisulfat 15 %;

Larutkan 150 g amonium peroksidisulfat dalam air jadikan volume menjadi 1 L.
- Larutan kalium peroksidisulfat 2 %;

Larutkan 20 g kalium peroksidisulfat dalam air jadikan volumenya menjadi 1 L.

3.7.4 Cara kerja

- a) Siapkan alat sesuai instruksi kerja alat;
- b) Penyiapan contoh;
 - Homogenkan contoh.
- c) Penetapan karbon organik terlarut;
 - Saring contoh dan air untuk blanko melalui saringan berpori 0,45 μm .
 - Contoh siap diuji
- d) Penetapan NPOC (nonpergeable organic carbon);
 - Ukur 15 mL sampai 30 mL contoh ke dalam Erlenmeyer.
 - Asamkan sampai pH 2.
 - Alirkan gas pencuci ke dalam contoh sesuai dengan instruksi kerja alat.
 - Contoh siap diuji.
- e) Injeksi contoh;
 - Ambil bagian contoh yang telah disiapkan dengan alat injeksi
 - Pilih ukuran/volume contoh sesuai dengan petunjuk dari manual alat.
 - Kocok contoh dengan pengaduk magnet, pilih jarum injeksi sesuai dengan ukuran partikel contoh.
 - Injeksikan contoh dan standar ke alat analisis sesuai dengan petunjuk alat dan catat respon yang terjadi
- f) Persiapan kurva standar;
 - Siapkan deret standar karbon organik dengan kisaran konsentrasi karbon organik di dalam contoh.
- g) Periksa larutan contoh, larutan standar dan blanko dengan alat TOC meter.

3.7.5 Perhitungan

- Koreksi puncak area standar dan contoh dengan mengurangi puncak area blanko air pereaksi.

- Plot kurva kalibrasi konsentrasi karbon standar dengan puncak area standar yang telah dikoreksi.
- Tetapkan karbon dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi.
- Untuk menetapkan TOC kurangi total karbon dengan karbon anorganik.

3.8 Nitrat

3.8.1 Prinsip

Pengukuran serapan UV pada 220 nm memungkinkan penentuan NO_3^- dengan cepat. Karena zat organik terlarut juga dapat menyerap pada 220 nm dan NO_3^- tidak dapat menyerap pada 275 nm, pengukuran kedua yang dilakukan pada 275 nm dapat digunakan untuk mengoreksi nilai NO_3^- . Penyaringan contoh bertujuan untuk menghilangkan gangguan yang mungkin dari partikel tersuspensi. Pengasaman dengan HCl 1N dirancang untuk mencegah gangguan dari hidroksida atau konsentrasi karbonat sampai dengan 1 000 mg CaCO_3/L . Klorida tidak berpengaruh terhadap penetapan.

3.8.2 Peralatan

- Spektrofotometer sinar tunggal atau sinar ganda yang mempunyai kisaran panjang gelombang 190 nm - 900 nm dan lebar celah 0,2 nm - 2 nm serta telah dikalibrasi;
- Pipet volume 50 mL, terkalibrasi;
- Labu ukur 50 mL, terkalibrasi;
- Pipet ukur 10 mL, terkalibrasi.

3.8.3 Pereaksi

- Air bebas nitrat;
Air suling yang telah mengalami 2 kali penyulingan.
- Larutan baku;
Panaskan serbuk kalium nitrat, KNO_3 dalam oven pada suhu 105 °C selama 24 jam. Larutkan 0,721 8 g dalam air suling bebas nitrat encerkan hingga 1 000 mL. 1,00 mL = 100 μg $\text{NO}_3^- - \text{N}$. Pengawetan: tambahkan 2 mL CHCl_3 , CHCl_3 larutan ini stabil selama 6 bulan.
- Larutan intermediate nitrat;
Encerkan 100 mL larutan intermediet menjadi 1 000 mL dengan air suling. 1,00 mL = 10 μg $\text{NO}_3^- - \text{N}$. Pengawetan: tambahkan 2 mL CHCl_3/L , larutan ini stabil selama 6 bulan.
- Larutan HCl 1 N.

3.8.4 Cara kerja

- Pembuatan kurva kalibrasi
Buat larutan standar kalibrasi nitrat dengan kepekatan 1; 2; 3; 4; dan 5 mg $\text{NO}_3^- - \text{N}/\text{L}$ dengan cara pipet masing-masing 5 mL; 10 mL; 15 mL; 20 mL; dan 25 mL larutan baku nitrat ke dalam labu ukur 50 mL. Impitkan volumenya sampai tanda tera dengan air suling bebas nitrat;
- Pipet contoh 50 mL dan masukkan ke dalam erlenmeyer 100 mL;
- Tambahkan 1 mL HCl 1 N ke dalam larutan standar dan contoh;
- Periksa contoh dan standar pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 220 nm dan 275 nm.

3.8.5 Perhitungan

- Kurangi pembacaan absorben standar dan contoh dari panjang gelombang 220 nm dengan panjang gelombang 275 nm.
- Buatlah kurva kalibrasi konsentrasi dan absorben standar hasil pengurangan.
- Hitung konsentrasi contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier. Dari hasil pengurangan absorben pada panjang gelombang 220 nm dan 275 nm.

3.9 Nitrit

3.9.1 Prinsip

Prinsip pengukuran kadar nitrit adalah berdasarkan pembentukan warna kemerah-merahan yang terjadi bila mereaksikan nitrit dengan asam sulfanilat dan N-(1-naftil etilen diamin dihidroklorida) pada pH 2,0 sampai pH 2,5.

3.9.2 Peralatan

- spektrofotometer sinar tunggal atau sinar ganda yang mempunyai kisaran panjang gelombang 190 nm - 900 nm dan lebar celah 0,2 nm - 2 nm terkalibrasi;
- pemanas listrik yang dilengkapi dengan pengatur suhu;
- pipet mikro ukuran 0,25 mL; 0,50 mL; dan 1,00 mL, terkalibrasi;
- buret 50 mL, terkalibrasi;
- labu ukur 100 mL dan 1 000 mL, terkalibrasi;
- gelas ukur 50 mL;
- pipet ukur 10 mL dan 50 mL, terkalibrasi;
- labu erlenmeyer 100 mL;
- gelas piala 500 mL.

3.9.3 Pereaksi

- Larutan baku 250 mg NO_2^- - N/L;
Larutkan 1,232 g natrium nitrit, NaNO_2 , dengan air suling 100 mL di dalam labu ukur 1 000 mL. Tambahkan 1 mL kloroform sebagai pengawet dan tambahkan air suling sampai tepat pada tanda garis.
- pereaksi warna (*color reagent*):
ke dalam 800 mL air suling bebas nitrit tambahkan 100 mL asam klorida 85 % dan 10 g sulfanilamid. Sesudah sulfanilamid seluruhnya larut, tambahkan 1 g N-(1-naftil)-etilendiamin dihidroklorida. Campur sampai larut, kemudian encerkan sampai 1 liter dengan air bebas nitrit. Larutan stabil sekitar 1 bulan bila disimpan dalam botol berwarna gelap dalam lemari es.
- Larutan asam sulfanilat;
Larutkan 5,0 g sulfanilamid dengan campuran 50 mL HCl pekat dan 300 mL air suling di dalam gelas piala 500 mL. Encerkan dengan air suling sehingga volumenya menjadi 500 mL
- Larutan naftil etilendiamin dihidroklorida;
Larutkan 500 mg N-(1-naftil etilendiamin dihidroklorida) dengan 100 mL air suling di dalam gelas piala 500 mL. Encerkan dengan air suling sehingga volumenya menjadi 500 mL, simpan di dalam botol berwarna gelap dan larutan ini harus diganti setiap bulan atau bila warna larutan menjadi coklat tua.

- Larutan asam klorida, HCl, 1 : 3;
Tambahkan 50 mL HCl pekat ke dalam gelas piala 250 mL yang berisi 150 mL air suling.
- Larutan natrium oksalat, $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, 0,025 M (0,05 N);
Larutkan 3,350 g kristal natrium oksalat dengan 100 mL air suling di dalam labu ukur 1 000 mL. Tambahkan air suling sampai tepat pada tanda garis
- Larutan fero amonium sulfat 0,05 M (0,05 N);
Larutkan 19,607 g fero amonium sulfat dan 20 mL asam sulfat pekat ke dalam labu ukur 1 000 mL yang berisi 100 mL air suling. Tambahkan air suling sampai tepat pada tanda garis.
- Larutan standar kalium permanganat 0,01 M (0,05 N);
Larutkan 1,6 g KMnO_4 dalam 1 L air suling, simpan dalam botol berwarna coklat biarkan selama 7 hari.
- Tetapkan molaritas KMnO_4 dengan cara :
Timbang 100 sampai 200 mg $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ anhidrat ke dalam gelas piala tambahkan 100 mL air suling aduk sampai larut, tambahkan 10 mL H_2SO_4 1 : 1, panaskan gelas piala pada suhu 90 °C sampai 95 °C. Segera titar dengan KMnO_4 yang akan ditetapkan sampai terjadi warna merah jambu terang. Pada waktu penitaran, pertahankan suhu pada 85 °C. Jika perlu panaskan gelas piala selama penitaran. Kerjakan penetapan blanko seperti di atas dengan memakai air suling dan H_2SO_4 1:1.

Perhitungan:

$$\text{Molaritas } \text{KMnO}_4 = \frac{g \times \text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4}{(A-B) \times 0,335\ 05}$$

keterangan:

A adalah volume larutan KMnO_4 yang digunakan untuk titrasi $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (mL);

B adalah volume larutan KMnO_4 yang digunakan untuk titrasi blanko (mL).

- Air suling bebas nitrit

Jika tidak diketahui bahwa air suling atau air demineral bebas dari NO_2^- , gunakan prosedur berikut untuk membuat air bebas nitrit:

- 1) Tambahkan ke dalam 1 L air suling masing-masing satu butir kristal kecil kalium permanganat dan barium hidroksida atau kalsium hidroksida. Lakukan penyulingan kembali dan buang 50 mL air suling yang pertama dan tampung air yang berikutnya. Warna merah dengan pereaksi DPD menunjukkan adanya permanganat.
- 2) Tambahkan 1 mL H_2SO_4 pekat dan 0,2 mL larutan MnSO_4 (36,4 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ /100 mL air suling) ke dalam masing-masing 1 L air suling, dan buat merah dengan 1 sampai 3 mL larutan KMnO_4 (400 mg KMnO_4 /L air suling Lakukan penyulingan kembali seperti pada butir 1.

3.9.4 Cara kerja

a) Penetapan kadar larutan baku nitrit;

Pipet 50,00 mL larutan baku nitrit, 50,00 mL larutan KMnO_4 0,05 N, dan 5 mL H_2SO_4 p.a dan masukkan ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL. Kocok dan panaskan di atas pemanas listrik pada suhu 70°C - 80°C , hilangkan warna KMnO_4 dengan penambahan 10 mL larutan natrium oksalat 0,05 M. Titrasi kelebihan natrium oksalat dengan larutan kalium permanganat 0,05 N sampai terbentuk sedikit warna merah muda dan catat pemakaian larutan kalium permanganat yang diperlukan. Lakukan hal yang sama terhadap air suling bebas nitrit yaitu langkah seperti cara diatas dengan mengganti larutan baku dengan air suling. Bila pembakuan dilakukan dengan larutan fero-amonium-sulfat 0,05 M menggantikan natrium oksalat, maka tidak dilakukan pemanasan akan tetapi proses reaksi antara kalium permanganat dan fero amonium sulfat dibiarkan selama 5 menit sebelum dititrasi dengan kalium permanganat.

Perhitungan kadar nitrit dalam larutan induk adalah sebagai berikut:

$$A = \frac{\{(B \times C) - (D \times E)\} \times 7}{F}$$

keterangan:

A adalah mg NO_2 -- N/mL dalam larutan induk NaNO_2 ;

B adalah volume KMnO_4 yang digunakan (mL);

C adalah normalitas larutan KMnO_4 ;

D adalah volume fero amonium sulfat atau natrium oksalat yang ditambahkan (mL);

E adalah normalitas larutan fero amonium sulfat atau natrium oksalat;

F adalah volume larutan baku NaNO_2 yang digunakan untuk titrasi (mL).

b) Pembuatan larutan standar baku nitrit, NO_2 -N;

Pipet larutan induk nitrit yang telah ditetapkan kadarnya ke dalam labu ukur 100 mL untuk memperoleh kadar nitrit sebesar 0,05 mg/L; 0,10 mg/L; 0,25 mg/L; dan 0,50 mg/L. Tambahkan air suling bebas nitrit sampai tepat pada tanda tera.

c) Pipet 50 mL contoh ke dalam labu Erlenmeyer 100 mL;

d) Ke dalam larutan standar dan contoh tambahkan 1 mL asam sulfanilat. Biarkan larutan tersebut bereaksi selama 2 menit - 8 menit. Tambahkan 1 mL larutan naftil etilendiamin dihidroklorida, aduk dan biarkan paling sedikit 10 menit, tetapi tidak lebih dari 2 jam. Masukkan ke dalam kuvet spektrofotometer dan absorbennya.

3.9.5 Perhitungan

Hitung kadar NO_2 -N dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

3.10 Amonium (Phenate method)

3.10.1 Prinsip

Fenol alkali dan hipoklorit beraksi dengan amonia membentuk biru indo fenol yang merupakan kandungan konsentrasi amonia. Warna biru terbentuk secara cepat dengan natrium nitro prusida.

3.10.2 Peralatan

- spektrofotometer dengan lebar celah kuvet 1,0 cm pada panjang gelombang 640 nm terkalibrasi;
- labu ukur 25 mL, 100 mL, 1 000 mL terkalibrasi;
- oven pada 100 °C terkalibrasi;
- neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- pipet mikro 1 mL, 5 mL dan 10 mL terkalibrasi;
- erlenmeyer 50 mL asah bertutup plastik.

3.10.3 Pereaksi

- Air suling bebas ammonia;
Tambahkan 0,1 mL H₂SO₄ p.a ke dalam 1 L air suling, kemudian lakukan penyulingan kembali. Simpan dalam botol gelas dan tambahkan resin kation asam.
- Larutan fenol ;
Campurkan 11,1 mL fenol cair (≥ 89 %) dengan etanol 95% v/v jadikan 100 mL. Siapkan setiap minggu.

Peringatan: gunakan sarung tangan dan pelindung mata dan kerjakan di tempat ventilasi yang baik untuk memperkecil semua personil terpapar zat yang mudah menguap dan beracun ini.

- Larutan natrium nitro prusida 0,5 % b/v;
Larutkan 0,5 g natrium nitroprusida dalam 100 mL air suling. Simpan dalam botol berwarna gelap sampai dengan 1 bulan.
- Larutan sitrat alkali;
Larutkan 200 g tri natrium sitrat dan 10 g natrium hidroksida dalam air suling, jadikan 1 000 mL dengan air suling.
- Larutan natrium hipoklorit ;
- Larutan komersial sekitar 5 %;
- Larutan pengoksidasi;
Campurkan 100 mL larutan sitrat alkali dengan 25 mL larutan natrium hipoklorid. Siapkan secara segar.
- Larutan baku amonium;
Larutkan 3,819 g NH₄Cl anhidrat (yang telah dikeringkan pada 100 °C) dengan air suling dalam labu ukur; 1 000 mL dan tepatkan sampai tanda tera.
1,00 mL = 1,00 mg N = 1.22 mg NH₃.
- Larutan standar amonium;
Siapkan larutan kurva kalibrasi dari larutan baku amonia dalam kisaran konsentrasi amonia dalam contoh

3.10.4 Persiapan contoh

Hilangkan residu klorin dari contoh dengan menambahkan 0,1 g NaAsO₂/L.

3.10.5 Cara kerja

- Pipet 25 mL contoh dan masukan ke dalam Erlenmeyer 50 mL tambahkan sambil langsung dikocok tiap masing-masing penambahan 1 mL larutan fenol, 1 mL larutan natrium nitro prusida dan 2,5 mL larutan pengoksidasi;
- Tutup contoh dengan tutup plastik biarkan warna timbul dalam suhu kamar (22 °C sampai 27 °C) yang terlindung dari cahaya minimal 1 jam. warna stabil dalam 24 jam;
- Ukur absorben pada panjang gelombang 640 nm.

3.10.6 Perhitungan

Hitung kadar nitrogen-amonia (N-NH₃) dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

3.11 Sulfat (metode spektrofotometri)

3.11.1 Prinsip

Ion sulfat akan diendapkan dalam medium asam asetat suasana asam dengan barium klorida (BaCl₂) membentuk kristal barium sulfat (BaSO₄). Absorben dari suspensi BaSO₄ diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm.

3.11.2 Peralatan

- Spektrofotometer sinar tunggal atau sinar ganda yang mempunyai kisaran panjang gelombang 190 nm - 900 nm dan lebar celah 0,2 nm - 2 nm serta telah dikalibrasi;
- Pengaduk magnet yang dilengkapi pengatur kecepatan putar tetap;
- Sendok kristal, 2 g – 3 g;
- Pipet ukur 5 mL; 10 mL; 20 mL; 25 mL dan 50 mL, terkalibrasi;
- Labu ukur 200 mL dan 1 000 mL, terkalibrasi;
- Labu erlenmeyer 125 mL;
- Gelas piala 600 mL.

3.11.3 Pereaksi

- Larutan bufer A;
Larutkan 30 g magnesium klorida MgCl₂.6H₂O; 5 g natrium asetat, CH₃COONa.3H₂O; 1,0 g kalium nitrat, KNO₃; dan 20 mL asam asetat, CH₃COOH (99 %) dalam 500 mL air suling dan jadikan 1 000 mL dengan air suling.
- Larutan bufer B (dipakai bila konsentrasi sulfat SO₄ dalam contoh kurang dari 10 mg/L);
Larutkan 30 g MgCl₂.6H₂O; 5 g CH₃COONa.3H₂O; 1,0 g KNO₃; 0,111 g natrium sulfat. Na₂SO₄ dan 20 mL asam asetat (99 %) dalam 500 mL air suling dan jadikan 1 000 mL.
- Kristal barium klorida, BaCl₂.2H₂O kristal 20 mesh - 30 mesh ; dalam standardisasi, kekeruhan merata akan dihasilkan dalam kisaran mesh ini dan buffer yang sesuai;
- Larutan baku sulfat 100 mg/L ;
Larutkan 0,147 9 g Na₂SO₄ anhidrat dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL dan tepatkan sampai tanda garis. Larutan standar sulfat 1,00 mL = 100 µg SO₄²⁻
Encerkan 10,4 mL standar titran H₂SO₄ 0,020 0 N yang tercantum dalam alkalinitas menjadi 100 mL dengan air suling atau Larutkan 0,147 9 g Na₂SO₄ anhidrat dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL dan tepatkan sampai tanda garis.

- Air suling yang mempunyai DHL 0,5 $\mu\text{mhos/cm}$ - 2,0 $\mu\text{mhos/cm}$.

3.11.4 Cara kerja

Pembentukan kekeruhan barium sulfat

- a) Ukur dengan teliti 100 mL contoh atau bagian yang dijadikan 100 mL ke dalam erlenmeyer 250 mL;
- b) Tambah 20 mL larutan bufer, aduk dengan alat pengaduk, sambil diaduk tambahkan 1 sendok spatula $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Mulai hitung waktu pengadukan selama 60 ± 2 detik pada kecepatan tetap;
- c) Siapkan kurva standar dengan konsentrasi 0 mg/L - 40 mg/L dengan jarak standar 5 mg/L;
- d) Koreksi untuk contoh berwarna dan keruh dengan menyiapkan blanko tanpa penambahan BaCl_2 .

3.11.5 Perhitungan

$$\text{mg SO}_4^{2-}/\text{L} = \frac{\text{mg SO}_4^{2-} \times 1\,000}{\text{mL contoh}}$$

Jika dipakai larutan bufer A tetapkan konsentrasi sulfat dalam contoh langsung dari kurva kalibrasi setelah mengurangi absorban contoh sebelum ditambah BaCl_2 /setelah absorben contoh dikurangi absorben contoh sebelum penambahan BaCl_2 . Jika dipakai larutan bufer B kurangi konsentrasi sulfat dalam contoh dengan konsentrasi sulfat dalam blanko .

Jika dipakai larutan bufer B kurangi konsentrasi blanko dari konsentrasi SO_4^{2-} yang jelas sebagaimana ditentukan di atas; karena kurva kalibrasi bukan garis yang lurus, sehingga tidak setara jika mengurangi absorban blanko dari absorban contoh.

Jika dipakai larutan bufer A tetapkan konsentrasi sulfat dalam contoh langsung dari kurva kalibrasi setelah absorben contoh dikurangi absorben contoh sebelum penambahan BaCl_2 . Jika dipakai larutan bufer B kurangi konsentrasi sulfat dalam contoh dengan konsentrasi sulfat dalam blanko.

3.12 Klorida

3.12.1 Pinsip

Dalam larutan netral atau sedikit alkali, kalium kromat (K_2CrO_4) dapat menunjukkan titik akhir pada penitaran klorida dengan perak nitrat (AgNO_3). Perak klorida (AgCl) diendapkan seluruhnya sebelum terbentuk perak kromat (AgCrO_4) yang berwarna kuning kemerah-merahan.

3.12.2 Peralatan

- Buret, 50 mL berwarna coklat terkalibrasi;
- Pipet 100 mL terkalibrasi;
- Labu ukur 50 mL, 1 000 mL terkalibrasi;
- Erlenmeyer 250 mL;
- Gelas ukur 100 mL.

3.12.3 Pereaksi

- Indikator kalium kromat, K_2CrO_4 5 %;
Larutkan 50 g kalium kromat (K_2CrO_4) dalam sedikit air. Tambahkan larutan perak nitrat ($AgNO_3$) sampai terbentuk endapan merah. Biarkan 12 jam kemudian saring dan diencerkan dengan air suling menjadi 1 L.
- Larutan standar perak nitrat ($AgNO_3$) 0,01 N;
Larutkan 2,395 g perak nitrat ($AgNO_3$) dalam air suling dan encerkan sampai volume 1 000 mL. Standardisasi terhadap larutan NaCl 0,014 1 N, 1,00 mL larutan $AgNO_3$ 0,014 1 N, setara dengan 0,500 mg Cl^- . Simpan larutan standar $AgNO_3$ dalam botol berwarna coklat.
- Larutan standar natrium klorida, NaCl 0,014 1 N;
Larutkan 824,0 mg NaCl yang sudah dikeringkan pada 140 °C selama 1 jam, dalam air suling dan encerkan sampai 1 000 mL. 1,00 mL setara dengan 0,500 mg Cl^- .
- Larutkan natrium hidroksida (NaOH) 1 N;
Larutkan 40 g NaOH dalam air suling dan encerkan sampai 1 l.
- Indikator fenoftalein 1%;
Timbang 1 g fenoftalein p.a. larutkan dengan alkohol 60 % hingga 10 mL.
- Larutan asam sulfat (H_2SO_4) 1 N;
Ukur 28 mL H_2SO_4 p.a, masukkan ke dalam 100 mL air suling di dalam labu ukur 1 000 mL (awas akan timbul panas), kemudian tambahkan air suling sampai tepat pada tanda garis.
- Hidrogen peroksida H_2O_2 30 %.

3.12.4 Cara kerja

- a) Ukur dengan teliti 100 mL contoh yang mempunyai nilai pH 7-10, apabila contoh tidak berada dalam kisaran pH tersebut, tambahkan H_2SO_4 N atau NaOH 1 N menjadi pH 7-10;
- b) Tambahkan 1 mL indikator K_2CrO_4 ;
- c) dengan larutan standar perak nitrat ($AgNO_3$) sampai timbul warna kuning kemerah-merahan;
- d) Lakukan titrasi blanko dengan mengukur dengan teliti 100 mL air suling dan selanjutnya kerjakan sama dengan perlakuan contoh;
- e) Lakukan pengerjaan duplo;
- f) Hitung kadar klorida (Cl^-) dalam contoh.

3.12.5 Perhitungan

$$MgCl/L = \frac{(A - B) N \times 35\,450}{V}$$

keterangan:

A adalah volume $AgNO_3$ yang dipakai penitaran contoh (mL);

B adalah volume $AgNO_3$ yang dipakai penitaran blanko (mL);

N adalah normalitas $AgNO_3$;

V adalah volume contoh (mL)

3.13 Fluorida

3.13.1 Prinsip

Metode spektrofotometri SPADNS berdasarkan reaksi fluorida dan penyerapan warna zirkonium. Fluorida bereaksi dengan menyerap warna zirkonium membentuk anion kompleks yang tidak berwarna ZrF_6^{2-} .

3.13.2 Peralatan

- Spektrofotometer sinar tunggal atau sinar ganda yang mempunyai kisaran panjang gelombang 190 nm - 900 nm dan lebar celah 0,2 nm – 2 nm serta telah dikalibrasi;
- Pipet 5 mL, 10 mL dan 50 mL terkalibrasi;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1000 mL, terkalibrasi;
- Buret 25 mL, terkalibrasi;
- Labu erlenmeyer asah 100 mL;
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg, terkalibrasi.

3.13.3 Pereaksi

- Larutan baku fluoride;
Larutkan 221,0 mg natrium fluoride anhidrat NaF dengan air suling di dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan dengan tepat tanda tera. 1,00 mL = 100 $\mu\text{g F}^-$.
- Larutan standar fluoride
Encerkan 100 mL Larutan stok fluoride dengan air suling di dalam labu ukur 1 000 mL dan tepatkan sampai tanda tera dengan air suling. 1,00 mL = 10 $\mu\text{g F}^-$.
- Larutan SPADNS (sodium 2-parasulfofenylazo 20-1,8-dihidroxy-3,6-naftalene disulfonat); juga disebut sebagai garam 4,5-dihidroksi-3-(parasulfofenylazo)-2,7-aftalen disulfonat asam trinitrium
Larutkan 958 mg SPADNS dalam labu 500 mL dan tepatkan sampai tanda tera dengan air suling. Larutan ini stabil selama paling sedikit 1 tahun jika terlindung dari sinar matahari langsung.
- Larutan asam zirkonil;
Timbang 133 mg zirkonil klorida oktahidrat, $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$ dan larutkan dalam 25 mL air suling. Tambahkan 350 mL HCl pekat dan encerkan dengan air suling sampai 500 mL;
- pereaksi asam zirkonil- Larutan SPADNS
campur pereaksi asam zirkonil- Larutan SPADNS dengan volume yang sama. Gabungan pereaksi ini stabil paling sedikit 2 tahun.
- Larutan pembanding;
Tambahkan 10 mL larutan SPADNS ke dalam 100 mL air suling. Encerkan 7 mL HCl pekat sampai 10 mL dan tambahkan ke dalam larutan SPADNS yang telah diencerkan. Larutan ini digunakan untuk mengenalkan spektrofotometer;
- Larutan natrium arsenit ($NaAsO_2$) ;
Larutkan 5,0 g $NaAsO_2$ dengan air suling dan encerkan hingga 1 000 mL.

3.13.4 Persiapan contoh

- a) Pipet 50 mL contoh uji secara duplo dan masukkan ke dalam labu erlenmeyer 100 mL;
- b) Apabila contoh uji keruh, saring contoh uji dengan saringan membran berpori 0,45 μm ;

- c) Apabila contoh uji mengandung klorin, hilangkan klorin, dengan cara tambahkan satu tetes (0,05 mL) larutan natrium arsenit/0,1 mg residu klorin dan kocok. Setiap contoh uji mengandung 0,1 mg/L klorin;
- d) Contoh siap diuji.

3.13.5 Cara kerja

- a) Pembuatan kurva kalibrasi;
Siapkan standar fluorida dengan kepekatan 0 mg/L - 1,40 mg/L fluorida. Pipet 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 4,0 mL; 5,0 mL dan 6 mL larutan standar masukkan ke dalam labu 50 mL, tepatkan sampai tanda tera dengan air suling dan kocok sampai serba sama
- b) Pipet 50 mL contoh ke dalam erlenmyer asah 100 mL;
- c) Tambahkan 5 mL larutan SPADNS dan 5 mL asam zirkonil klorida atau 10 mL larutan campuran SPADNS dan asam zirkonil klorida. Kocok sampai serba sama;
- d) Baca absorben larutan standar dan contoh pada alat spektrofotometer pada panjang gelombang 570 nm.

3.13.6 Perhitungan

Hitung kadar fluorida di dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

3.14 Sianida

3.14.1 Prinsip

Sianida bebas diubah menjadi sianogen klorida (CNCl) dengan penambahan kloramin T pada pH < 8, dan direaksikan dengan pereaksi asam barbiturat-piridin sehingga menghasilkan warna merah kebiru-biruan. Warna tersebut dibaca pada panjang gelombang 570 nm

3.14.2 Peralatan

- Spektrofotometer pada panjang gelombang 570 nm, lebar celah kuvet 10 mm, terkalibrasi;
- Penangas air ;
- pH meter terkalibrasi;
- Pengaduk magnetik;
- Buret mikro 5 mL, skala terkecil 0,01 mL, terkalibrasi;
- Corong pemisah, 500 mL;
- Corong gelas;
- Gelas piala, 250 mL;
- Pipet 10 mL, 20 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL, terkalibrasi;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL, 250 mL, 1 000 mL, terkalibrasi;
- Pinggan porselin;
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg, terkalibrasi.

3.14.3 Pereaksi

- Larutan bufer fosfat 3 N;
Larutkan 138 g natrium dihidrogen fosfat monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) dengan air suling dalam labu ukur 1 L dan tepatkan sampai tanda tera. Simpan dalam lemari pendingin.

- Larutan kloramin-T;
Larutkan 1,0 g serbuk kloramin T dengan air suling dalam labu ukur 100 mL, tepatkan volumenya, kocok dan simpan dalam lemari pendingin. Larutan stabil selama satu minggu.
- Larutan piridin-asam barbiturat;
Timbang 15 g asam barbiturat-masukkan dalam labu ukur 250 mL, larutkan dengan air suling dan tambahkan 75 mL piridin. Tambahkan 15 mL HCl pekat dan larutan diencerkan hingga volume 250 mL.
- Larutan NaOH 0,04 M;
Larutkan 1,6 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 1 L, tepatkan volumenya hingga tanda tera dengan penambahan air suling.
- Larutan baku sianida;
Larutkan 2,5 g KCN dengan air suling dalam labu 1 L, tepatkan sampai tanda tera, kemudian kocok. Simpan dalam botol coklat yang tertutup. Tetapkan kadarnya seminggu sekali;
- Penetapan konsentrasi CN mint dari larutan standar;
Pipet 10 mL larutan baku sianida ($\pm 1\ 000$ mg/L) ke dalam erlenmeyer (duplo) encerkan dengan larutan pengencer NaOH 0,04 M sampai volume ± 100 mL, untuk blanko gunakan larutan NaOH 0,04 M, tambahkan larutan indikator rodamina 1 mL, homogenkan. Titrasi dengan larutan standar-AgNO₃ sampai perubahan warna pertama dari kuning jernih menjadi coklat merah muda kekuning-kuningan, catat volume larutan standar AgNO₃ yang dipakai.

Perhitungan

Konsentrasi CN dalam larutan baku dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{CN mg/L} = \frac{(A-B) \times 1\ 000}{V \times 54\ N}$$

keterangan:

A adalah volume AgNO₃ untuk titrasi baku sianida, (mL);

B adalah volume AgNO₃ untuk titrasi blanko, (mL);

V adalah volume larutan baku sianida yang dititrasi, (mL);

N adalah normalitas larutan perak nitrat, AgNO₃.

- Indikator;
Larutkan 20 mg p-dimethyl aminobenzalrhodamina dalam 100 mL aceton dalam gelas ukur 100 mL
- NaCl kristal;
- Larutan kalium kromat, K₂CrO₄ 5%;
Larutkan 12,5 g K₂CrO₄ dengan air suling dalam gelas piala 250 mL. Tambahkan larutan AgNO₃ sampai terbentuk endapan merah nyata, biarkan 12 jam, saring, tepatkan volumenya sampai 1 L dengan air suling.
- Larutan standar perak nitrat;
 - Larutkan 3,27 g AgNO₃ dalam labu ukur 1 L dengan air suling, encerkan sampai tanda garis.
 - Tetapkan normalisasi sesuai dengan cara kerja sebagai berikut :

- Timbang 0,824 0 g NaCl (yang telah dikeringkan pada 140 °C, selama 2 jam), masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL, larutkan, encerkan dan tepatkan volumenya dengan air suling sampai ekuivalen (larutan NaCl ekuivalen dengan 0,014 1 N).
- Pipet 10 mL larutan di atas ke dalam erlenmeyer (duplo), encerkan dengan air suling hingga 100 mL, tambahkan 2 mL larutan indikator K_2CrO_4 5 %, kocok titar dengan larutan $AgNO_3$ sampai terjadi perubahan warna, kecoklat-coklatan, catat volume $AgNO_3$.

Perhitungan:

Normalitas larutan $AgNO_3$ dapat dihitung dengan rumus:

$$N_{AgNO_3} = \frac{(V_1 \times N_1)}{V_2 - V_b}$$

keterangan:

V_1 adalah volume larutan NaCl, (mL);

N_1 adalah normalitas NaCl, (mL);

V_2 adalah volume larutan $AgNO_3$, (mL);

V_b adalah volume larutan $AgNO_3$ untuk blanko, (mL).

3.14.4 Cara kerja

- Pipet 20 mL contoh ke dalam labu ukur 50 mL;
- Larutan deret standar;
Pipet 10 mL larutan baku sianida 1 000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL, encerkan dengan air suling hingga tanda garis (Larutan I). Pipet 10 mL larutan I ke dalam labu ukur 100 mL, encerkan dengan air suling hingga tanda garis (larutan II). Pipet 10 mL larutan II ke dalam labu ukur 100 mL, encerkan dengan air suling hingga tanda garis (Larutan III ekuivalen dengan 1 mg CN^- /L).
- Larutan standar sianida 0,02 sampai 0,12 mg/L.
Pipet 1 mL; 2 mL; 3 mL; 4 mL; 5 mL; dan 6 mL larutan III ke dalam labu ukur 50 mL, encerkan dengan NaOH 0,04 M sampai volume larutan \pm 35 mL.
- Buat larutan blanko menggunakan 35 mL larutan NaOH 0,04 M;
- Tambahkan 2 mL larutan kloramin T ke dalam contoh, larutan standar dan blanko kemudian aduk, dan segera tambahkan 5 mL larutan piridin asam barbiturat, aduk lagi pelan-pelan. Encerkan dengan NaOH 0,04 M sampai tanda garis dan kocok. Biarkan selama 8 menit, ukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 570 nm.

3.14.5 Perhitungan

Hitung kadar sianida dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier

$$CN^- \text{ (mg/L)} = \frac{A \times 50}{20}$$

keterangan:

A adalah hasil pembacaan;

50 adalah volume akhir (mL);

20 adalah volume contoh (mL).

3.15 Besi (Fe)

3.15.1 Metode Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) Tungku karbon

3.15.1.1 Prinsip

Analisis cemaran logam Fe dengan SSA menggunakan lampu katoda Fe berdasarkan penyerapan energi radiasi oleh atom-atom Fe pada tingkat energi dasar dengan atomisasi tungku karbon.

3.15.1.2 Peralatan

- SSA tungku karbon, terkalibrasi;
- Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL, terkalibrasi;
- Saringan membran 0,45 μm ;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1 000 mL terkalibrasi;
- Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- Tabung reaksi 20 mL;
- Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- Penangas listrik.

3.15.1.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam;
Air suling yang telah mengalami 2 kali penyulingan.
- Asam Nitrat HNO_3 p.a;
- Larutan induk besi 1 000 mg/L;
- Larutan baku besi 10 mg/L;
Pipet 1 mL larutan induk Fe 1 000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambah air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- Larutan standar Fe; 0 $\mu\text{g/L}$; 20 $\mu\text{g/L}$; 40 $\mu\text{g/L}$; 60 $\mu\text{g/L}$ dan 80 $\mu\text{g/L}$;
Pipet masing-masing 0 mL; 0,20 mL; 0,40 mL; 0,60 mL; 0,80 mL. Larutan baku Fe 10 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

3.15.1.4 Persiapan Contoh

- a) Saring larutan contoh 50 mL sampai 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 μm .
- b) Asamkan contoh sampai $\text{pH} < 2$ dengan HNO_3 p.a.
- c) Bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL tambahkan 5 mL HNO_3 p.a dan batu didih kemudian uapkan di atas penangas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL.
- d) Pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai berimpit tanda garis.
- e) Contoh siap diuji.

3.15.1.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh menggunakan SSA tungku karbon.

3.15.1.6 Perhitungan

Hitung kadar besi dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

3.15.2 Metode uji secara inductively coupled plasma (ICP)

Lihat 3.26.8.

3.16 Mangan

3.16.1 Metode Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) Tungku karbon

3.16.1.1 Prinsip

Analisis cemaran logam Mn dengan SSA menggunakan lampu katoda Mn berdasarkan penyerapan energi radiasi oleh atom-atom Mn pada tingkat energi dasar dengan atomisasi tungku karbon.

3.16.1.2 Peralatan

- SSA tungku karbon terkalibrasi;
- Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi;
- Saringan membran 0,45 μm ;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1 000 mL terkalibrasi;
- Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- Tabung reaksi 20 mL;
- Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- Penangas listrik.

3.16.1.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam;
Air suling yang telah mengalami 2 kali penyulingan.
- Asam nitrat HNO_3 p.a;
- Larutan induk mangan 1 000 mg/L;
- Larutan baku mangan 10 mg/L;
Pipet 1 mL larutan induk Mn 1 000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambah air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL /L) sampai tanda garis.
- Larutan standar Mn : 0 $\mu\text{g/L}$; 2,5 $\mu\text{g/L}$; 5,0 $\mu\text{g/L}$; 7,5 $\mu\text{g/L}$ dan 10 $\mu\text{g/L}$;
Pipet masing-masing 0 mL; 0,25 mL; 0,50 mL; 0,75 mL; dan 1,0 mL larutan baku Mn 10 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

3.16.1.4 Persiapan contoh

- a) Saring larutan contoh 50 mL sampai 100 mL menggunakan saringan membran 0,45 μm ;
- b) Asamkan contoh sampai $\text{pH} < 2$ dengan HNO_3 p.a;
- c) Bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL tambahkan 5 mL HNO_3 pekat dan batu didih kemudian uapkan di atas penangas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL;

- d) Pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai berimpit tanda garis;
- e) Contoh siap diuji.

3.16.1.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh menggunakan SSA tungku karbon.

3.16.1.6 Perhitungan

Hitung kadar mangan dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

3.16.2 Metode uji secara inductively coupled plasma (ICP)

Lihat 3.26.8.

3.17 Klor bebas

3.17.1 Prinsip

Bila N, N-dietil-p-fenilendiamin (DPD) sebagai indikator dibubuhkan pada suatu larutan yang mengandung sisa klor aktif akan membentuk warna merah. Warna yang terjadi dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 515 nm

3.17.2 Ruang lingkup.

Metode ini meliputi prosedur pengujian klorin dalam contoh Air, AMDK, dan Air Limbah secara DPD Colorimetri, dengan konsentrasi minimum 10 $\mu\text{g Cl}$ sebagai Cl_2/L .

3.17.3 Peralatan

- Spektrofotometer,terkalibrasi
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi
- Oven terkalibrasi
- Pipet mikro 1 mL sampai 10 mL terkalibrasi
- Labu ukur 100 mL, 500 mL dan 1 000 mL terkalibrasi
- Gelas piala 500 m

3.17.4 Pereaksi

- Larutan dapar fospat
larutkan 24 g dinatrium hidrogen fospat anhidrat, Na_2HPO_4 dan 46 g kalium dihidrogen fospat, KH_2PO_4 dalam air suling, satukan dengan 100 mL air suling yang mengandung 800 mg EDTA,
Larutkan sampai 1 liter dengan air suling. Dan bisa juga ditambahkan 20 mg HgCl_2 atau 2 tetes toluene, untuk mencegah pertumbuhan jamur. Gangguan dari sejumlah kecil iodide dalam pereaksi dapat diiadakan dengan penambahan 20 mg HgCl_2 kedalam larutan.
- larutan indikator DPD.
Larutkan 1 g DPD oksalat atau 1,5 g DPD sulfat pentahidrat atau 1,1 g DPD sulfat Anhidrat dalam air suling bebas klorin yang mengandung 8 mL H_2SO_4 1+3 dan 200 mg dinatrium EDTA, jadikan sampai 1 liter. Simpan dalam botol coklat dan tempat yang

gelap. Musnahkan bila terjadi perubahan warna. absorpsinya secara berkala, musnahkan larutan bila absorpsinya pada panjang gelombang 515 nm melebihi 0,002/cm.

- Larutan Standar Titration Ferroammoniumsulfat (FAS).
Larutkan 1,106 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ke dalam air suling yang mengandung 1 mL H_2SO_4 1 + 3, dan jadikan 1 liter dengan air suling yang baru dididihkan dan didinginkan. Standar ini dapat digunakan selama 1 bulan. Periksa titer larutan dengan kalium dikromat dengan cara sebagai berikut :
Tambahkan 10 mL H_2SO_4 1 + 5; 5 mL H_2SO_4 pa dan 2 mL barium diphenylamine Sulfonat 0,1 %, kedalam 100 mL larutan standar FAS. Titar dengan kalium dikromat sampai titik akhir berwarna coklat yang stabil selama 30 detik. FAS titran ekuivalen dengan 100 μg Cl sebagai Cl_2 /1,00 mL, dibutuhkan 20,00 mL larutan kalium dikromat untuk titrasi.
- kristal KI.
- Larutan kalium iodida
Larutkan 500 mg KI dan encerkan sampai 100 mL memakai air suling yang baru dididihkan dan didinginkan simpan dalam botol gelas coklat, simpan dalam lemari es, ganti jika larutan berwarna kuning.
- Larutan kalium dikromat.
Larutkan 0,691 g sampai 100 mL.
- Barium diphenylamine sulfonat 0,1 %.
Larutkan 0,1 g $(\text{C}_6\text{H}_5\text{NHC}_6\text{H}_4\text{-4-SO}_3)_2\text{Ba}$ dalam 100 mL air suling.
- Larutan natrium arsenit.
Larutkan 5,0 g NaAsO_2 dalam air suling dan encerkan sampai 1 000 mL.
- Air bebas butuh klorin.
Siapkan air suling kualitas baik atau air diionisasi tambahkan klorin bebas sehingga mengandung 5 mg/L klorin bebas. Setelah dibiarkan 2 hari larutan ini akan mengandung paling sedikit 2 mg/L klorin bebas, jika tidak hilangkan sisa klorin bebas untuk mendapatkan air yang lebih baik. Hilangkan sisa klorin bebas dengan menyimpan air tersebut dibawah sinar matahari atau diiridiasi menggunakan lampu UV selama beberapa jam. Ambil contoh tambah KI dan ukur total klorin dengan cara kolorimetri menggunakan tabung Nessler

3.17.5 Cara kerja

3.17.5.1 Kalibrasikan alat spektrofotometer dengan larutan klorin atau kalium permanganate.

- a. Larutan klorin : Siapkan deret standar larutan klorin dalam rentang 0,05 sampai 4 mg/L dari dari larutan klorin 100 mg/L yang telah distandarisasi dengan cara berikut : Masukkan 2 mL asam asetat dan 10 mL sampai 26 mL air bebas klorin dalam erlenmeyer. Tambah 1 gram KI ukur volume untuk mendapatkan pilihan yang tepat, dimana 1 mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,025 N ekuivalen dengan 0,9 mg klorin. Titar dengan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,025 N yang telah distandarisasi, sampai warna kuning dari iodium hampir hilang. Tambah 1 sampai 2 mL penunjuk kanji, lanjutkan titrasi sampai warna biru hilang. Tetapkan blanko dengan menambahkan volume yang sama dari asam, KI dan penunjuk kanji kedalam air bebas butuh klorin dengan volume yang sama.

Jika terbentuk warna biru titrasi dengan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,025 N sampai warna hilang, catat hasil titrasi Blanko dalam rumus negatif.

Jika tidak terbentuk warna biru, titrasi dengan larutan iod 0,028 2 N sampai berwarna biru. Titrasi kembali dengan larutan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,025 N sampai warna biru hilang, catat perbedaan hasil titrasi.

Blanko dalam rumus positif.

$$\text{mg Cl sebagai Cl}_2/\text{mL} = \frac{(A \pm B) \times N \times 35,45}{\text{mL larutan klorin}}$$

keterangan :

A = mL titrasi untuk larutan klorin

B = mL titrasi untuk blanko (ditambah atau dikurangi sesuai hasil titrasi)

N = Normalitas dari $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Siapkan standar dengan memakai air bebas butuh klorin dan peralatan gelas. kembangkan warna dengan pertama-tama tambahkan 5 mL larutan dafar fosfat dan 5 mL pereaksi indikator DPD dalam Erlenmeyer, tambahkan 100 mL standar klorin, kocok. Baca warna dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 515 nm. Kembalikan larutan standar klorin dari kuvet kedalam Erlenmeyer titrasi dengan larutan standar FAS seperti menetapkan konsentrasi klorin.

- b. Larutan kalium permanganat : Siapkan larutan stock yng mengandung 891 mg KMnO_4 dalam 1 000 mL. Encerkan 10,00 mL larutan stock jadikan 100 mL air suling dalam labu ukur. Bila 1 mL larutan stock yang diencerkan menjadi 100 mL dengan air suling akan dihasilkan klorin yang eqivalen dengan 1 mg/L dalam reaksi dengan DPD. Siapkan deret standar KMnO_4 sesuai dengan rentang yang eqivalen dengan klorin antara 0,05 mg/L sampai 4 mg/L. Kembangkan warna dengan pertama-tama tambahkan 5 mL larutan dafar fosfat dan 5 mL pereaksi indikator DPD dalam Erlenmeyer, tambahkan 100 mL standar KMnO_4 , kocok. Baca warna dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 515 nm. Kembalikan larutan dari kuvet ke dalam Erlenmeyer titrasi dengan larutan standar FAS seperti menetapkan konsentrasi klorin, sebagai pengecekan absorpsi kalium permanganat oleh air suling. Hasil semua pembacaan dibandingkan dengan warna-warna standar atau kurva standar sebelum dipakai dalam perhitungan.
- c. Volume contoh : gunakan volume contoh sesuaikan dengan photometri atau colorimetri mengikuti prosedur diatas berdasarkan pemakaian volume contoh 10 mL pakailah jumlah pereaksi sesuai volume contoh yang dipakai. Encerkan contoh dengan air bebas butuh klorin bila total klorin lebih dari 4 mg/L.
- d. Klorin bebas : masukkan masing-masing 0,5 mL larutan dapar fospat dan penunjuk DPD ke dalam kuvet spektrofotometer, tambahkan 10 mL contoh baca warna segera (pembacaan A).
- e. Monokloramine: lanjutkan dengan penambahan sedikit kristal KI ($\pm 0,1$ mg KI) kemudian kocok jika konsentrasi dichloramine dimungkinkan tinggi tambah 0,1 mL (2 tetes) larutan KI segar (0,1 g/100 mL) baca warna segera (pembacaan B)
- f. Dikloramine : Lanjutkan dengan penambahan kristal KI ($\pm 0,1$ g KI) kemudian kocok sampai larut. Biarkan selama 2 menit ,kemudian baca warna. (pembacaan C)
- g. Nitrogen triklorida : masukkan sedikit kristal KI ($\pm 0,1$ mg KI) kedalam kuvet bersih, tambahkan 10 mL contoh dan kocok. Masukkan masing-masing 0,5 mL larutan dafar posfat dan penunjuk DPD kedalam kuvet yang kedua dan kocok, kemudian tambahkan kedalam kuvet yang pertama.baca warna segera. (pembacaan N).

- h. Koreksi khromat memakai tioasetamida: Tambahkan 0,5 mL larutan tioasetamida kedalam 100 mL contoh dan kocok. Tambahkan masing-masing 0,5 mL larutan dapar fospat dan penunjuk DPD, baca warna segera. Tambah kristal KI ($\pm 0,1$ g KI) kemudian kocok sampai larut, biarkan selama 2 menit, kemudian baca warna. Kurangi pembacaan pertama dari pembacaan A dan pembacaan kedua dari pembacaan C dan pakai dalam perhitungan.

3.17.5.2 Perhitungan ;

| Pembacaan | NCl_3 ,absen | NCl_3 ,ada |
|--------------------------|------------------------|--|
| A | Klorin bebas | Klorin bebas |
| B – A | NH_2Cl | NH_2Cl |
| C – B | NHCl_2 | $\text{NHCl}_2 + \frac{1}{2} \text{NCl}_3$ |
| N | - | klorin bebas + $\frac{1}{2} \text{NCl}_3$ |
| $2(\text{N} - \text{A})$ | - | NCl_3 |
| C – N | - | NHCl_2 |

Pada pembentukkan bahwa monokloramin terdapat dengan NCl_3 akan termasuk dalam pembacaan N dalam hasil NCl_3 dari $2(\text{N} - \text{B})$

3.18 Kromium (Cr)

3.18.1 Metode Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) Tungku karbon

3.18.1.1 Prinsip

Analisis cemaran logam Cr dengan SSA menggunakan lampu katoda Cr berdasarkan penyerapan energi radiasi oleh atom-atom Cr pada tingkat energi dasar dengan atomisasi tungku karbon.

3.18.1.2 Peralatan

- SSA tungku karbon, terkalibrasi;
- Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL, terkalibrasi;
- Saringan membran 0,45 μm ;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1 000 mL terkalibrasi;
- Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- Tabung reaksi 20 mL;
- Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- Penangas listrik.

3.18.1.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam;
Air suling yang telah mengalami dua kali penyulingan.
- Asam nitrat, HNO_3 p.a;
- Larutan induk Cr 1 000 mg/L;
Larutkan baku Cr 10 mg/L.
Pipet 1 mL larutan induk Cr 1 000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 p.a. (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- Larutan standar Cr 0 μg ; 10 μg ; 20 μg ; 30 μg dan 40 μg ;

Pipet masing-masing 0 mL; 0,1 mL; 0,20 mL; 0,3 mL; dan 0,4 mL larutan baku Cr 10 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

3.18.1.4 Persiapan contoh

- Saring larutan contoh 50 mL sampai 100 mL menggunakan saringan membran 0,45 μm .
- Asamkan contoh sampai $\text{pH} < 2$ dengan HNO_3 p.a.
- Bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL tambahkan 5 mL HNO_3 p.a, dan batu didih kemudian uapkan di atas penangas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL.
- Pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- Contoh siap diuji.

3.18.1.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh menggunakan SSA tungku karbon.

3.18.1.6 Perhitungan

Hitung kadar Cr dalam contoh dengan menggunakan kurva standar atau persamaan garis regresi linier. Kadar Kromium (Cr) = Hasil Pembacaan.

3.18.2 Metode uji secara inductively coupled plasma (ICP)

Lihat 3.26.8.

3.19 Barium (Ba)

3.19.1 Metode Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) Tungku karbon

3.19.1.1 Prinsip

Analisis cemaran logam Ba dengan SSA berdasarkan penyerapan energi radiasi oleh atom – atom Ba pada tingkat energi dasar dengan atomisasi tungku karbon.

3.19.1.2 Peralatan

- SSA tungku karbon, terkalibrasi;
- Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL, terkalibrasi;
- Saringan membran 0,45 μm ;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1 000 mL terkalibrasi;
- Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- Tabung reaksi 20 mL;
- Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- Penangas listrik.

3.19.1.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam;
Air suling yang telah mengalami dua kali penyulingan.
- Asam nitrat, HNO_3 p.a;

- Larutan Induk ,Ba 1 000 mg/L;
- Larutan baku Ba, 10 mg/L;
Pipet larutan induk Ba, 1 000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- Larutan standar Ba 0 μg /L; 50 μg /L; 100 μg /L; 150 μg /L; 200 μg /L;
Pipet masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL. Larutan baku Ba 10 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

3.19.1.4 Persiapan contoh

- a) Saring larutan contoh 50 mL sampai 100 mL menggunakan saringan membran 0,45 μm .
- b) Asamkan contoh sampai pH < 2 dengan HNO_3 p.a.
- c) Bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas penangas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL.
- d) Pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- e) Contoh siap diuji.

3.19.1.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh dengan menggunakan SSA tungku karbon.

3.19.1.6 Perhitungan

Hitung kadar barium dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier. Hasil pembacaan = kadar barium (Ba).

3.19.2 Metode uji secara inductively coupled plasma (ICP)

Lihat 3.26.8.

3.20 Selenium (Se)

3.20.1 Metode Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) Tungku karbon

3.20.1.1 Prinsip

Analisis cemaran logam Se dengan SSA menggunakan lampu katoda Se berdasarkan penyerapan energi radiasi oleh atom-atom Se pada tingkat energi dasar dengan atomisasi tungku karbon.

3.20.1.2 Peralatan

- SSA tungku karbon terkalibrasi;
- Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi;
- Saringan membran 0,45 μm ;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1 000 mL terkalibrasi;
- Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- Tabung reaksi 20 mL;
- Gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- Penangas listrik.

3.20.1.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam;
Air suling yang telah mengalami 2 kali penyulingan.
- Asam nitrat HNO_3 p.a;
- Larutan induk Se 1 000 mg/L;
- Larutan baku Se 10 mg/L;
Pipet 1 mL larutan baku Se 1 000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambah air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- Larutan Standar Se: 0 $\mu\text{g/L}$; 25 $\mu\text{g/L}$; 50 $\mu\text{g/L}$; 75 $\mu\text{g/L}$; dan 100 $\mu\text{g/L}$;
Pipet masing-masing 0 mL; 0,25 mL; 0,50 mL; 0,75 mL; dan 1,00 mL larutan baku Se 10 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

3.20.1.4 Persiapan contoh

- a) Saring larutan contoh 50 mL - 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 μm .
- b) Asamkan contoh sampai $\text{pH} < 2$ dengan HNO_3 p.a.
- c) Bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas penangas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL.
- d) Pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- e) Contoh siap diuji.

3.20.1.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh dengan menggunakan SSA tungku karbon.

3.20.1.6 Perhitungan

Hitung kadar Se dalam contoh dengan menggunakan kurva standar atau persamaan garis regresi linier. Kadar Selenium (Se) = Hasil Pembacaan.

3.20.2 Metode SSA natrium borohidrid

3.20.2.1 Prinsip

Analisis cemaran logam Se dengan SSA menggunakan lampu katoda Se berdasarkan penyerapan energi radiasi oleh atom-atom Se pada tingkat energi dasar dengan atomisasi uap hidrid.

3.20.2.2 Peralatan

- SSA dan generator uap hidrid terkalibrasi;
- Pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi;
- Saringan membran 0,45 μm ;
- Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1 000 mL terkalibrasi;
- Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- Tabung reaksi 20 mL;
- Gelas piapa 150 mL dan 500 mL;

- Penangas listrik.

3.20.2.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam;
Air suling yang telah mengalami 2 kali penyulingan.
- Asam nitrat HNO_3 p.a;
- Larutan induk Se 1 000 mg/L;
- Larutan baku Se 10 mg/L;
Pipet 1 mL larutan baku Se 1 000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambah air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL /L) sampai tanda garis.
- Larutan Standar Se: 0 $\mu\text{g/L}$; 25 $\mu\text{g/L}$; 50 $\mu\text{g/L}$; 75 $\mu\text{g/L}$; dan 100 $\mu\text{g/L}$;
Pipet masing-masing 0 mL; 0,25 mL; 0,50 mL; 0,75 mL; dan 1,00 mL larutan baku Se 10 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

3.20.2.4 Persiapan contoh

- a) Saring larutan contoh 50 mL - 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 μm .
- b) Asamkan contoh sampai pH < 2 dengan HNO_3 p.a.
- c) Bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas penangas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL.
- d) Pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- e) Contoh siap diuji.

3.20.2.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh menggunakan spektrofotometer serapan atom. Generator uap hidrid.

3.20.2.6 Perhitungan

Hitung kadar Se dalam contoh dengan menggunakan kurva standar atau persamaan garis regresi linier.

3.20.3 Metode uji secara inductively coupled plasma (ICP)

Lihat 3.26.8.

3.21 Perak (Ag)

3.21.1 Metode Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) Tungku karbon

3.21.1.1 Prinsip

Analisis cemaran logam Ag dengan SSA menggunakan lampu katoda Ag berdasarkan penyerapan energi radiasi oleh atom-atom Ag pada tingkat energi dasar dengan atomisasi tungku karbon.

3.21.1.2 Ruang Lingkup

Metode uji ini meliputi prosedur pengujian kandungan cemaran logam Ag dalam contoh AMDK secara SSA tungku karbon dengan kisaran konsentrasi antara 0,2 µg/L – 25 µg/L.

3.21.1.3 Peralatan

- SAA tungku karbon, terkalibrasi
- Buret mikro 10 mL, terkalibrasi
- Saringan membran 0,45 µm
- Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1 000 mL terkalibrasi
- Pipet volumetri 1 mL, 10 mL dan 100 mL terkalibrasi
- Kaca arloji
- Gelas piala 150 mL dan 500 mL
- Penangas listrik

3.21.1.4 Pereaksi

- Air suling bebas logam - Air suling yang telah mengalami 2 kali penyulingan.
- Asam Nitrat HNO₃ p.a *suprapure*.
- Larutan standar Ag 1 000 mg/L (*traceable to NIST SRM*)
- Larutan baku perak 10 mg/L - Pipet 1 mL larutan baku perak 1 000 mg/L kedalam labu ukur 100 mL, tambah air suling bebas logam yang mengandung HNO₃ (1,5 mL HNO₃ /L) sampai tanda garis.
- Larutan baku perak 1 000 µg/L - Pipet 10 mL larutan baku perak 10 mg/L kedalam labu ukur 100 mL tambah air suling bebas logam yang mengandung HNO₃ (1,5 mL HNO₃ /L) sampai tanda garis.
- Larutan deret standar Ag; 0 µg/L; 2,5 µg/L; 5,0 µg/L; 7,5 µg/L; 10 µg/L dan 20 µg/L - Pipet masing-masing 0 mL; 0,25 mL; 0,50 mL; 0,75 mL; 1,00 mL dan 2,00 mL larutan baku Ag 1 000 µg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan air suling bebas logam yang mengandung HNO₃ (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

3.21.1.5 Cara Kerja

- Asamkan contoh sampai pH < 2 dengan HNO₃ p.a., contoh siap diuji
- Pipet 100 mL contoh yang telah diasamkan sampai pH < 2 ke dalam gelas piala 150 mL tambahkan 5 mL HNO₃ p.a *suprapure* dan tutup gelas piala dengan kaca arloji untuk menghindari kontaminasi, kemudian uapkan diatas pemanas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL (selama minimal 2 jam), jaga suhu pemanas jangan sampai larutan mendidih.
- Pindahkan contoh kedalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO₃ (1,5 mL/L), himpitkan sampai tanda garis.
- Kerjakan penetapan blanko dengan cara di atas dengan mengganti contoh menggunakan air suling.

- e) Periksa contoh dengan menggunakan spektrofotometer serapan atom tungku karbon dengan kondisi alat sebagai berikut :

| | |
|------------------------------|----------------------------------|
| Panjang Gelombang | : 328,1 nm |
| Slit | : 0,5 |
| Modifier | : 1 % Ammonium dihidrogen fosfat |
| <i>Background Correction</i> | : Zeeman |
| Sumber Cahaya | : Lampu HC (katoda) Ag |
| <i>Lamp Current</i> | : 4,0 mA |
| Gas | : Argon UHP |

3.21.1.6 Perhitungan

Hitung kadar perak dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

$$C (\mu\text{g/L}) = \frac{(A-a)}{B}$$

Keterangan :

C = Konsentrasi Perak dalam contoh

A = Absorbansi contoh perak

a = Intersep dari kurva kalibrasi standar perak

B = Slope dari kurva kalibrasi standar perak

3.21.2 Metode uji secara inductively coupled plasma (ICP)

3.21.2.1 Prinsip

Analisa cemaran logam Ag dengan ICP berdasarkan pada ionisasi persentasi yang tinggi dari atom yang dihasilkan oleh plasma yang bersuhu tinggi.

3.21.2.2 Ruang lingkup

Metode uji ini meliputi prosedur pengujian kadar cemaran logam Ag dalam contoh Air Minum secara ICP dengan kisaran konsentrasi 0,00 µg/L sampai 200 µg/L.

3.21.2.3 Peralatan

- ICP terkalibrasi
- Pipet mikro 0,5 mL, 1,0 mL, 5,0 mL, dan 10 mL terkalibrasi
- Saringan membran 0,45 µm
- Labu ukur 50 mL, 100 mL, 250 mL dan 1 000 mL terkalibrasi
- Pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi
- Gelas piala 150 mL dan 500 mL
- Pemanas listrik

3.21.2.4 Pereaksi

- Air suling bebas logam - Air suling yang telah mengalami 2 kali penyulingan.
- Asam Nitrat HNO₃ *supra pure*.
- Asam Nitrat (HNO₃ 1+1) *supra pure*.
Tambahkan 1 bagian HNO₃ ke dalam 1 bagian air bebas logam,
- Asam Klorida (HCl,p,a).
- Asam Klorida (HCl 1+1)

- Tambahkan 1 bagian HCl ke dalam 1 bagian air bebas logam.
- f) Larutan induk logam Ag 100 mg/ liter
 - g) Larutkan 0,157 5 gram Perak Nitrat (AgNO_3) dalam 100,0 mL air suling, kemudian tambahkan 10 mL Asam Nitrat (HNO_3) dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL. (1.00 mL = 100 ug Ag)
 - h) Larutan baku 10 mg/L logam Ag.
Pipet 10,0 mL larutan induk logam Ag 100 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian tambahkan 5 mL HNO_3 *supra pure*(1+1) dan 5 mL HCl (1+1), tepatkan sampai tanda batas dengan air suling bebas logam.
 - j) Buat deret standar dari larutan baku logam Ag 10 mg/L sesuai dengan konsentrasi perak dalam sampel air minum, tambahkan 2 mL HNO_3 (1+1) dan 10 mL HCl (1+1) tepatkan sampai tanda batas dengan air bebas logam.

3.21.2.5 Cara Kerja

3.21.2.5.1 Untuk contoh yang mengandung matriks yang kompleks

Pipet 100 mL contoh dengan pengawetan HNO_3 yang telah dihomogenkan ke dalam gelas piala 150 mL, tambahkan 3 mL HNO_3 *supra pure*, dan batu didih, tutup dengan kaca arloji, panaskan di atas pemanas listrik sampai volumenya < 10 mL (pastikan contoh tidak sampai mendidih) dan pada bagian dasar gelas piala tidak ada bagian yang kering, dinginkan. Tambahkan lagi 5 mL HNO_3 *supra pure* tutup dengan kaca arloji dan panaskan kembali di atas pemanas listrik dan naikan suhunya, lanjutkan penambahan asam sampai destruksi sempurna atau larutan menjadi jernih atau penampakan tidak berubah pada penambahan asam dan pemanasan berikutnya, Dinginkan, tambah 10 mL HCl (1+1) dan 15 mL air bebas logam, panaskan kembali selama 15 menit untuk melarutkan endapan atau residu. Dinginkan, bilas dinding gelas piala dan kaca arloji dengan air bebas logam, pindahkan ke dalam labu ukur 100 mL sambil dibilas, tepatkan sampai tanda batas dengan air suling bebas logam. Saring dan masukkan ke dalam botol khusus logam

3.21.2.5.2 Untuk contoh yang matriknya tidak kompleks.

Pipet 100 mL contoh dengan pengawetan HNO_3 yang telah dihomogenkan kedalam gelas piala, tambahkan 2 mL HNO_3 (1+1) dan 10 mL HCl (1+1), tutup dengan kaca arloji, panaskan di atas pemanas listrik sampai volumenya ± 20 mL (pastikan contoh tidak sampai mendidih). Dinginkan, saring untuk menghilangkan zat yang tidak larut atau alternatif lain di *centrifuge*, atau dibiarkan semalam. Pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL dan tepatkan sampai tanda tera.

3.21.2.5.3 Periksa contoh dengan menggunakan ICP.

3.21.2.6 Perhitungan

Hitung kandungan logam dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier, Konsentrasi logam dihitung sebagai berikut :

$$\text{Konsentrasi Ag } (\mu\text{g/L}) = \frac{(A-a)}{B}$$

Keterangan :

A = Intensitas Ratio

a = Intersep dari kurva kalibrasi standar Al

B = Slope dari kurva kalibrasi standar Al

3.22 Boron (B)

3.22.1 Metode spektrofotometri (kurkumin)

3.22.1.1 Prinsip

Sampel air yang mengandung boron apabila diasamkan dan diuapkan, maka akan terbentuk produk berwarna merah dengan adanya kurkumin, yang disebut *rosocyanine*. Warna merah dari *rosocyanine* tersebut kemudian dibandingkan dengan standar menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

3.22.1.2 Peralatan

- Spektrofotometer, digunakan pada panjang gelombang 540 nm, dengan lintasan cahaya minimal 1 cm;
- Sawan penguapan, kapasitas 100 sampai 150 mL, dari kaca silika, platina, atau bahan lain yang sesuai;
- Penangas air, diatur pada 55 °C;
- Labu volumetrik kaca yang tertutup kapasitas 25 mL dan 50 mL;
- Kolom *ion-exchange*, panjang 50 cm dengan diameter 1,3 cm.

3.22.1.3 Pereaksi

Simpan seluruh pereaksi dalam botol polietilen atau botol bebas boron

- Larutan stok boron;
Timbang 571,6 mg asam borat anhidrat, H_3BO_3 dalam air suling dan encerkan sampai 1 000 mL; 1,00 mL = 100 µg boron, B. H_3BO_3 akan kehilangan berat pada pengeringan 105 °C, oleh karena itu pereaksi yang digunakan harus memenuhi spesifikasi ACS atau yang setara dan disimpan dalam botol tertutup kuat.
- Larutan standar boron;
Encerkan 10,00 mL larutan stok boron dengan air suling sampai 1 000 mL; 1,00 mL = 1,00 µg boron, B.

CATATAN perhatikan faktor maksimal 1 kali pengenceran (20 x).

- Pereaksi kurkumin;
Timbang 40 mg kurkumin² yang digiling halus dan 5,0 g asam oksalat lalu larutkan dalam 80 mL etil alkohol 95%. Tambah 4,2 mL HCl pekat, tepatkan sampai 100 mL dengan etil alkohol dalam labu volumetrik 100 mL, dan saring jika pereaksi keruh (isopropil alkohol, 95%, dapat digunakan menggantikan etil alkohol). Pereaksi ini stabil selama beberapa hari jika disimpan dalam lemari es;
- Etil alkohol 95% atau isopropil alkohol 95%;
- Asam klorida, HCl, 1 + 5.

3.22.1.4 Cara kerja

- Tindakan pencegahan: kontrol variabel yang erat seperti volume dan konsentrasi pereaksi, maupun waktu dan suhu pengeringan. Gunakan cawan penguapan yang identik dalam bentuk, ukuran dan komposisi untuk memastikan waktu evaporasi sama karena meningkatkan waktu akan meningkatkan intensitas warna yang dihasilkan;
- Pembuatan kurva kalibrasi:

² Eastman No. 1179, atau derajat pereaksi (*reagent grade*)

- 1 Pipet 0 (blangko), 0,25 mL; 0,50 mL; 0,75 mL dan 1,00 mL larutan standar boron ke dalam cawan penguapan yang sama jenis (tipe), bentuk dan ukuran.
 - 2 Tambahkan air suling ke masing-masing standar dan tepatkan volume menjadi 1 mL.
 - 3 Tambah 4,0 mL pereaksi kurkumin ke masing-masing standar dan aduk perlahan supaya tercampur sempurna.
 - 4 Letakkan cawan di atas penangas air pada suhu ($55\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) dan biarkan selama 80 menit yang umumnya cukup untuk mengeringkan dan menghilangkan HCl. Jaga waktu pengeringan konstan untuk standar dan contoh. Sesudah cawan-cawan dingin sampai suhu ruang, tambah 10 mL etil alkohol 95% ke masing-masing cawan dan aduk perlahan dengan batang pengaduk polietilen untuk menjamin pelarutan sempurna produk yang berwarna merah.
 - 5 Bilas isi cawan ke dalam labu volumetrik 25 mL, menggunakan etil alkohol 95%. Tepatkan sampai tanda tera dengan etil alkohol 95% dan aduk rata dengan cara membalik.
 - 6 Baca absorban standar dan contoh pada panjang gelombang 540 nm sesudah menetapkan pereaksi blangko pada absorban 0. Kurva kalibrasi linier dari 0 sampai 1,00 μg boron sehingga diperoleh persamaan garis $y = ax + b$ dengan $r > 0,995$. Lakukan pembacaan fotometri dalam waktu 1 jam dari pengeringan contoh;
- c) Perlakuan contoh: untuk air yang mengandung 0,10 mg Boron/L sampai 1,00 mg Boron/L, gunakan 1,00 mL contoh. Untuk air yang mengandung lebih dari 1,00 mg Boron/L buat pengenceran yang tepat dengan air suling bebas boron, supaya 1,00 mL contoh mengandung sekitar 0,50 μg boron.
1. Pipet 1,00 mL contoh atau pengenceran ke dalam cawan penguapan.
 2. Lanjutkan seperti di 3.22.1.4 b), dimulai dengan Tambah 4,0 mL pereaksi kurkumin dan seterusnya. jika larutan akhir keruh, saring melalui kertas saring sebelum membaca absorbansi.
 3. Hitung kandungan boron dari kurva kalibrasi. Jika kurva kalibrasi tidak ditentukan pada waktu yang sama, maka buat blangko dan standar yang mengandung 0,50 μg boron dan dikerjakan secara bersamaan dengan contoh.
 4. Lanjutkan seperti di 3.22.1.4 b).3, dimulai dengan tambah 4,0 mL pereaksi kurkumin dan seterusnya. jika larutan akhir keruh, saring melalui kertas saring sebelum membaca absorbansi.
 5. Hitung kandungan boron dari perbandingan absorbansi;
- d) Apabila kesadahan air tinggi dan gangguan kation, maka perlu dilakukan proses sebagai berikut:
- 1 siapkan kolom *ion-exchange* dengan diameter sekitar 20 cm \times 1,3 cm. Isi kolom dengan kation - *exchange* bersifat asam kuat resin.
 - 2 Cuci kembali kolom dengan air suling untuk menghilangkan gelembung udara yang terperangkap. Jaga resin tertutup dengan cairan setiap waktu.
 - 3 Lewatkan 50 mL 1 + 5 HCl melalui kolom dengan kecepatan 0,2 mL asam/mL resin dalam kolom/menit dan cuci kolom bebas dari asam dengan air suling.
 - 4 Pipet 25 mL contoh, atau sedikit contoh yang diketahui kandungan boronnya tinggi lalu encerkan sampai 25 mL, ke dalam kolom resin.
 - 5 Atur kecepatan aliran sampai sekitar 2 tetes / detik dan kumpulkan buangan dalam 50 mL labu ukur.
 - 6 Cuci kolom dengan sedikit air suling sampai tanda garis. Campur dan pindahkan 2 mL ke dalam cawan penguapan.
 - 7 Tambah 4,0 mL pereaksi kurkumin dan selesaikan analisis seperti pada 3.22.1.4 b).3.

3.22.1.5 Perhitungan

Gunakan persamaan berikut ini untuk menghitung konsentrasi boron berdasarkan kurva kalibrasi

$$\text{mg Boron/L} = \frac{C}{S}$$

Keterangan:

C = μg Boron dari perhitungan menggunakan kurva kalibrasi;

S = mL contoh.

Jika menggunakan perbandingan absorbansi, hitung berdasarkan persamaan berikut :

$$\text{mg Boron/L} = \frac{A_2 \times C}{A_1 \times S}$$

Keterangan:

A₁ = absorbansi standar;

A₂ = absorbansi contoh;

C = μg Boron dalam standar yang diambil;

S = mL contoh.

3.22.2 Metode Spektrofotometri (karmin/karminik)

3.22.2.1 Prinsip

Keberadaan Boron dalam larutan karmin atau karminik dalam asam sulfat pekat akan mengubah warna dari merah terang ke merah kebiru-biruan atau biru tergantung pada jumlah boron.

3.22.2.2 Peralatan

- Spektrofotometer dengan lebar celah 1,0 cm pada panjang gelombang 515 nm terkalibrasi;
- Neraca analitik dengan ketelitian 0,1 mg terkalibrasi;
- Oven terkalibrasi;
- Pipet mikro 1 mL sampai 10 mL terkalibrasi;
- Saringan membran 0,45 μm ;
- Labu ukur 50 mL dan 1 000 mL terkalibrasi;
- Gelas piala 250 mL dan 500 mL;
- Penangas air;
- Tabung reaksi 30 mL.

3.22.2.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam;
- Air suling yang telah mengalami dua kali penyulingan.
- Asam klorida, HCl p.a;
- Asam sulfat, H₂SO₄ p.a;
- Larutan karmin;
Larutkan 920 mg karmin N.F.40 atau asam karminik dalam 1 000 mL H₂SO₄ p.a.
- Larutan induk boron;
Larutkan 571,6 mg asam borat anhidrat, H₃BO₃, dalam 500 mL air suling bebas logam dan diencerkan tepat 1 000 mL dengan air suling bebas logam (1,00 mL = 100 μg B).
- Larutan standar boron 0 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 2,5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 7,5 $\mu\text{g/mL}$, dan 10 $\mu\text{g/mL}$.

Pipet masing-masing 0 mL, 1 mL, 2,5 mL, 5 mL, 7,5 mL, dan 10 mL larutan induk B ke dalam labu ukur 100 mL kemudian encerkan dengan air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 p.a. (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

3.22.2.4 Persiapan contoh

- Pipet 2 mL setiap larutan standar dan contoh ke dalam masing-masing tabung reaksi 30 mL.
- Tambahkan 2 tetes HCl p.a., 10 mL H_2SO_4 p.a. secara hati-hati ke dalam setiap larutan standar dan contoh, masing-masing dikocok dan biarkan mencapai suhu ruang.
- Tambahkan 10 mL pereaksi karmin pada setiap perlakuan, kocok, dan biarkan 45 menit sampai 60 menit.
- Contoh siap diuji.

3.22.2.5 Cara kerja

Periksa absorben larutan standar dan contoh dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 585 nm.

3.22.2.6 Perhitungan

Hitung kadar boron (B) dalam contoh dengan menggunakan kurva standar atau persamaan garis regresi linier.

3.22.3 Metode uji secara inductively coupled plasma (ICP)

Lihat 3.26.8.

3.23 Bromat

3.23.1 Prinsip

- Jika perlu, contoh sebelumnya diberi perlakuan untuk menghilangkan ozon, khlorin dioksida, klorit, logam-logam dan padatan lihat sub pasal 3.23.5 (Pengambilan contoh dan perlakuan pendahuluan contoh). Bromat dipisahkan dengan kromatografi ion (*Ion Chromatography/IC*). Resin penukar anion (*anion exchange*) digunakan sebagai fase diam (*stationary phase*) dan salah satu asam (misalnya asam sulfat) atau larutan encer garam-garam dari asam lemah berbasis satu atau asam berbasis dua digunakan sebagai eluen pada metode *isocratic* atau gradien. Sebagai contoh, eluen dapat berupa garam karbonat, hidrogen karbonat, hidroksida eluen asam, yang dapat disiapkan secara manual atau secara otomatis. Lihat 3.23.2.m.
- Deteksi bromat, BrO_3^- , densitas (ρ) $\geq 0,5 \mu\text{g/L}$ dapat dicapai dengan menggunakan larutan bersifat asam dari kalium iodida yang berisi sejumlah katalis molibdenum (VI) dimana bromat bereaksi dengan iodida membentuk iodium yang tidak stabil. Iodium tersebut bereaksi dengan kalium iodida membentuk ion tri-iodida pada tahap *post column reaction (PCR)*, yang serapannya (absorpsi) diukur pada panjang gelombang UV sebesar 352 nm

3.23.2 Pereaksi

Gunakan pereaksi yang bermutu derajat pereaksi (*analytical grade*). Timbang pereaksi dengan ketelitian $\pm 1\%$ dari massa nominal, kecuali dinyatakan lain. Jika perlu, siapkan larutan alternatif seperti yang dijelaskan dalam 3.23.2.m (eluen) sampai 3.23.2.s (larutan kalibrasi bromat)

- a) Air, mutu 1 (*deionized water*) (konduktivitas < 0,05 μS);
- b) natrium karbonat, Na_2CO_3 ;
- c) asam sulfat, H_2SO_4 , konsentrasi 1 M;
- d) natrium hidroksida, NaOH ;
- e) kalium hidroksida, KOH ;
- f) natrium hidrogenkarbonat, NaHCO_3 ;
- g) amonium heptamolibdat tetrahidrat, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$;
- h) kalium iodida, KI ;
- i) asam nitrat HNO_3 , densitas (ρ) 1,41 g/mL;
- j) besi (II) sulfat heptahidrat, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- k) kalium bromat, KBrO_3 ;
- l) etilendiamin, $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2$, 99%;
- m) eluen;

Hilangkan gas dalam semua eluen yang digunakan. Ambil tindakan untuk menghindari timbulnya udara baru selama pengoperasian (misalnya dengan mengalirkan gas helium dalam saluran untuk menghilangkan gelembung gas).

Pemilihan eluen tergantung dari pemilihan kolom dan detektor; lihat petunjuk penggunaan alat dari pemasok kolom. Penggabungan yang dipilih dari kolom pemisah dan eluen harus sesuai dengan persyaratan resolusi yang ditentukan dalam sub pasal 3.23.4 (persyaratan mutu).

Penggunaan *eluent* harus memenuhi persyaratan dalam sub pasal 3.23.4 (persyaratan mutu) dan 3.23.6.3 (pengukuran bromat).

Pilihan pereaksi untuk *eluent* umum terdapat dalam butir b (Natrium karbonat, Na_2CO_3) sampai butir f (Natrium hidrogen karbonat, NaHCO_3). Contoh *eluent* yang umum digunakan terdapat dalam butir 2 dan butir 3 di bawah.

1. Natrium karbonat induk, $\text{Na}_2\text{CO}_3 = 0,09 \text{ M}$
larutkan 9,54 g natrium karbonat dengan air dalam labu ukur 1 000 mL encerkan dengan air dan tepatkan sampai tanda tera. Larutan stabil selama 6 bulan jika disimpan pada suhu dari 2 °C sampai dengan 8 °C
2. *Eluent* natrium karbonat, $\text{Na}_2\text{CO}_3 = 0,009 \text{ M}$
ambil 100 mL natrium karbonat induk ($\text{Na}_2\text{CO}_3 = 0,09 \text{ M}$) dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan sampai tanda tera dengan air
3. *Eluent* asam sulfat, $\text{H}_2\text{SO}_4 = 0,1 \text{ M}$
Ambil 100 mL asam sulfat induk ($\text{H}_2\text{SO}_4 = 1 \text{ M}$) dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan sampai tanda tera dengan air

CATATAN Amonium heptamolibdat tetrahidrat, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dapat ditambahkan ke *eluent* yang tersedia dengan komposisi yang sesuai dengan hasil konsentrasi pereaksi *PCR* dalam unit *PCR*

- n) larutan amonium heptamolibdat, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} 0,002 \text{ M}$;
Larutkan 0,25 g amonium heptamolibdat tetrahidrat, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dalam 100 mL air. Larutan stabil selama 1 bulan jika disimpan dalam botol yang kedap cahaya pada suhu kamar.
- o) pereaksi *post column reaction/PCR*;
 1. Hilangkan semua gas dalam air yang digunakan untuk membuat pereaksi *PCR*. Ambil langkah untuk menghindari timbulnya udara baru selama pengoperasian (misalnya dengan menyemprot helium).
 2. Larutkan 45 g kalium iodida, KI di dalam kurang lebih 500 mL air, tambah 25 mL larutan amonium heptamolibdat $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} 0,002 \text{ M}$ dalam 1 000 mL labu ukur dan tepatkan sampai tanda tera dengan air.

3. Alirkan gas helium ke dalam larutan selama 20 menit untuk menghilangkan seluruh oksigen terlarut, dan segera menempatkannya dalam *PCR module* dan beri tekanan dengan helium.
4. Larutan mengandung kalium iodida 0,27 M dan amonium heptamolibdat 0,05 mM. Buat larutan pada saat akan digunakan. Simpan larutan dalam botol yang kedap cahaya (misalnya dibungkus dengan aluminium foil) dan lindungi larutan dari paparan cahaya.

CATATAN karena kalium iodida peka cahaya, larutan bisa berubah menjadi berwarna kuning terang/kuning muda dengan berjalannya waktu, walaupun disimpan dalam helium. Hal ini dapat dicegah dengan penambahan natrium hidroksida konsentrasi 0,001 M.

- p) larutan besi (II), Fe^{2+} 1 000 mg/L;
timbang 0,124 g besi (II) sulfat heptahidrat, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, larutkan dalam campuran 6 μL asam nitrat HNO_3 1,41 g/mL dan kurang lebih 15 mL air. Encerkan sampai tanda tera dengan air dalam labu ukur 25 mL. Dihasilkan nilai pH larutan sekitar 2, dan larutan stabil selama 2 hari.

- q) larutan stok standar bromat, BrO_3^- 1 000 mg/L;
Keringkan sekitar 1,5 g kalium bromat, KBrO_3 minimal 1 jam pada $(105 \pm 5)^\circ\text{C}$. Simpan padatan yang telah kering dalam desikator.

Larutkan $(1,306 \pm 0,001)$ g KBrO_3 yang telah dikeringkan dengan sekitar 800 mL air dalam labu ukur 1 000 mL dan encerkan sampai tanda tera dengan air. Simpan larutan pada 2°C sampai 8°C dalam botol *polyethene* atau botol kaca dan perbaharui larutan ini setiap 12 bulan. Kemungkinan lain, gunakan stok larutan yang tersedia secara komersial dengan konsentrasi yang diperlukan.

- r) Larutan standar bromat;
tergantung pada konsentrasi yang diperkirakan, buat larutan standar dengan konsentrasi bromat yang berbeda dari larutan stok standar bromat, BrO_3^- 1 000 mg/L.

CATATAN kemungkinan resiko perubahan konsentrasi yang disebabkan oleh interaksi dengan bahan wadah, yang meningkat dengan menurunnya konsentrasi bromat. Simpan larutan standar dalam botol *polyethene* atau botol kaca.

1. Larutan standar bromat I, BrO_3^- 100 mg/L
Pipet 10,0 mL Larutan stok standar bromat BrO_3^- 1 000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan sampai tanda tera dengan air. Simpan larutan pada 2°C sampai 8°C dalam botol *polyethene* atau botol kaca. Larutan stabil selama 6 bulan.
2. Larutan standar bromat II, BrO_3^- 1 mg/L
Pipet 1,0 mL Larutan standar I BrO_3^- 100 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL dan encerkan sampai tanda tera dengan air. Simpan larutan pada 2°C sampai 8°C dalam botol *polyethene* atau botol kaca. Larutan stabil selama 3 bulan.

- s) Larutan kerja (kalibrasi) bromat;
Tergantung pada konsentrasi bromat yang diperkirakan dalam contoh, gunakan larutan standar bromat I BrO_3^- 100 mg/L atau larutan standar bromat II, BrO_3^- 1 mg/L untuk membuat 5 sampai 10 larutan kalibrasi, bagikan menurut kisaran kerja yang diperkirakan secara merata. Misalnya, lakukan seperti berikut untuk kisaran 0,5 $\mu\text{g/L}$ sampai 5 $\mu\text{g/L}$ bromat. Pipet, ke dalam satu rangkaian labu ukur 100 mL volume berikut ini 50 μL , 100 μL , 150 μL , 200 μL , 250 μL , 300 μL , 350 μL , 400 μL , 450 μL dan 500 μL larutan standar bromat II BrO_3^- 1 mg/L dan encerkan sampai tanda tera dengan air. Konsentrasi larutan kalibrasi bromat ini berturut-turut adalah 0,5 $\mu\text{g/L}$, 1,0 $\mu\text{g/L}$, 1,5 $\mu\text{g/L}$, 2,0 $\mu\text{g/L}$,

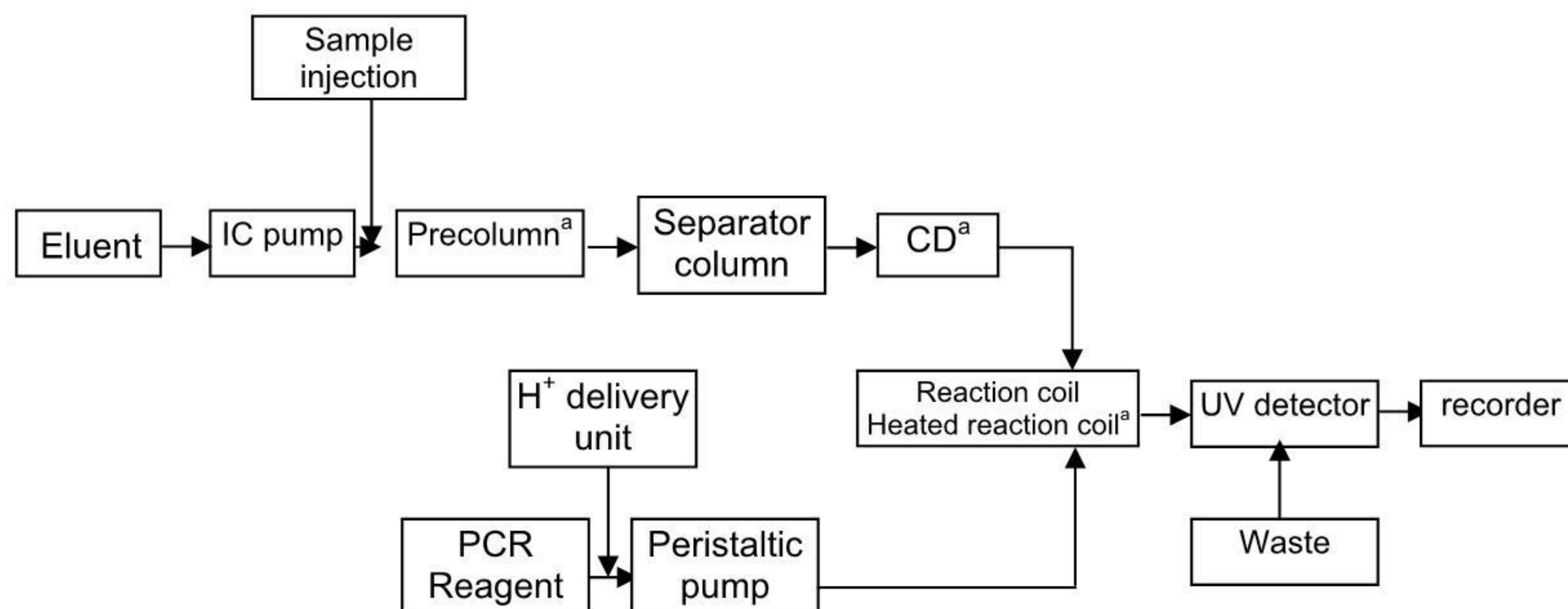
2,5 µg/L, 3,0 µg/L, 3,5 µg/L, 4,0 µg/L, 4,5 µg/L dan 5,0 µg/L. Buat larutan kalibrasi di hari pemakaian.

- t) Larutan blangko;
Isi labu ukur, misalnya dengan air 100 mL.

3.23.3 Peralatan

Peralatan laboratorium yang biasa dan secara khusus, berikut ini.

- a) Sistem *IC*, sesuai dengan persyaratan mutu yang ditentukan dalam pasal 3.23.4 (Persyaratan mutu), misalnya resolusi. Secara umum, harus terdiri dari komponen berikut ini (lihat Gambar 1)
- *Eluent reservoir*, dan unit penghilang gas
 - Pompa *IC*, cocok untuk teknik *isocratic* atau *gradient*
 - Alat pengiriman contoh (*sample delivery device*), misalnya pompa contoh, termasuk sistem injeksi contoh dilengkapi dengan *loop* contoh untuk volume yang sesuai (misalnya 0,1 mL sampai 1 mL) atau alat autosampler (*autosampler device*)
 - Alat perekam (*recording device*), misalnya *personal computer* dengan *software* untuk akuisisi data dan evaluasi
 - *Post column Reaction (PCR)*, yang terdiri dari:
 1. Penampung pereaksi *PCR*
 2. Unit pengiriman H^+ misalnya penampung H_2SO_4 , unit penekan (*suppressor unit*)
 3. Sistem pengiriman pereaksi, misalnya pompa peristaltik
 4. *Reaction coil* misalnya 500 µL volume internal
 5. *Reaction coil heater*, mampu mempertahankan suhu 80 °C
 - detektor UV, misalnya spektrofotometer: 190 nm - 400 nm



Gambar 1 – Skema sistem kromatografi ion termasuk *in-line PCR system*

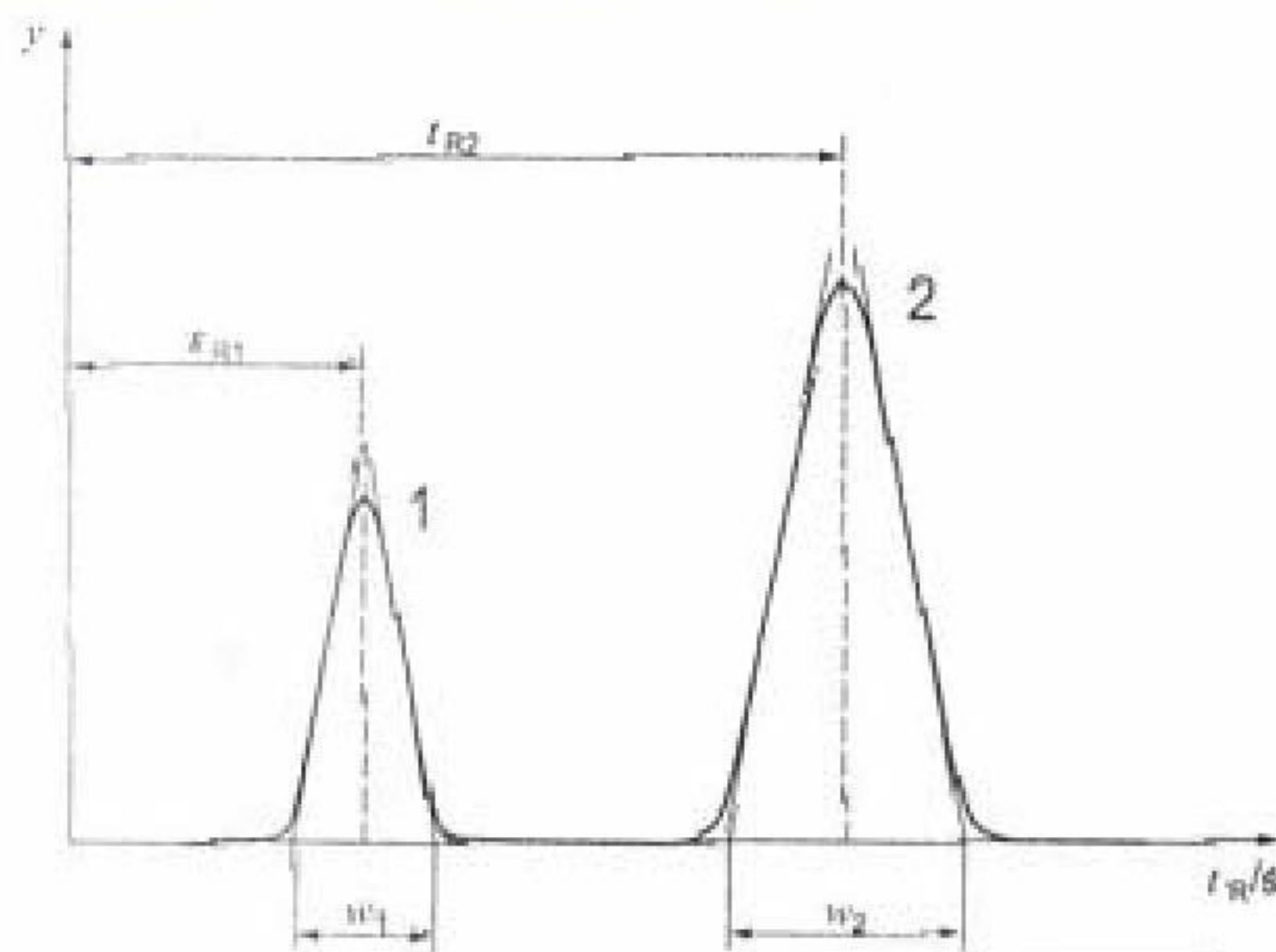
b) Catridges

- Cation exchanger dalam bentuk Na (catridges)
- Catridges dengan fase non-polar yang akan digunakan untuk persiapan contoh (misalnya *polyvinylpyrrolidone*)

3.23.4 Persyaratan mutu

3.23.4.1 Kolom pemisah

Dalam kromatogram contoh dan larutan standar bromat, resolusi puncak, R , di antara bromat dan puncak terdekat tidak boleh berada di bawah 1,3 [lihat persamaan (1) dan Gambar 2]. Atur kondisi pemisahan yang sesuai.



Keterangan gambar :

- W_1 lebar puncak 1
- W_2 lebar puncak 2
- t_R waktu retensi
- y sinyal
- 1 puncak 1
- 2 puncak 2

Gambar 2 – Gambaran grafis dari parameter untuk menghitung resolusi puncak, R

CATATAN 1 dalam ruang lingkup standar ini, perhitungan resolusi, R , cocok untuk kedua *isocratic* dan *gradient elution*

hitung resolusi puncak untuk sepasang puncak 2,1, $R_{2,1}$, menggunakan persamaan (1)

$$R_{2,1} = \frac{2(tR_2 - tR_1)}{W_2 + W_1}$$

Keterangan:

tR_1 adalah waktu retensi, dalam hitungan detik, untuk puncak pertama

tR_2 adalah waktu retensi, dalam hitungan detik, untuk puncak kedua

w_1 adalah lebar puncak, dalam hitungan detik, pada sumbu waktu puncak pertama

w_2 adalah lebar puncak, dalam hitungan detik, pada sumbu waktu puncak kedua

CATATAN 2 nilai-nilai w_1 dan w_2 adalah lebar dasar segitiga sama kaki dibangun di atas masing-masing puncak *Gaussian*

3.23.4.2 Kondisi PCR

- Persyaratan analisis yang khusus dijelaskan pada sub pasal 3.23.4.3 (keadaan kromatografi dan PCR untuk kromatogram ditunjukkan pada Gambar 3) dan sub pasal 3.23.4.4 (keadaan kromatografik dan PCR untuk kromatogram ditunjukkan pada Gambar 4);
- atur konsentrasi amonium heptamolibdat berkisar 11 μM dan 15 μM dan konsentrasi kalium iodida berkisar 55 mM dan 65 mM;
- diperbolehkan merubah parameter prosedur (misalnya laju aliran, konsentrasi iodida atau konsentrasi amonium heptamolibdat dalam *eluent* atau *post column reaction/PCR*). jika digunakan, hitung dengan menggunakan persamaan (2)

$$q_{v1} \cdot c_1 + q_{v2} \cdot c_2 = (q_{v1} + q_{v2}) \cdot c_3$$

Keterangan:

q_{v1} laju aliran *eluent*, dalam mililiter per menit;

c_1 konsentrasi, dalam mol per liter (M), dari larutan amonium heptamolibdat dalam *eluent*;

q_{v2} laju aliran, dalam mililiter per menit, dari pompa PCR

c_2 konsentrasi, dalam mol per liter (M), dari larutan amonium heptamolibdat atau kalium iodida dalam preaksi PCR;

c_3 konsentrasi, dalam mol per liter (M), dari larutan amonium heptamolibdat atau kalium iodida setelah menjalani prosedur pencampuran di unit PCR

CONTOH contoh perhitungan konsentrasi amonium heptamolibdat dalam PCR module

Aliran *eluent*

$q_{v1} = 0,7 \text{ mL/menit}$

Konsentrasi amonium heptamolibdat dalam *eluent*

$c_1 = 0 \mu\text{M}$

Aliran PCR

$q_{v2} = 0,2 \text{ mL/menit}$

Konsentrasi amonium heptamolibdat dalam pereaksi PCR

$c_2 = 50 \mu\text{M}$

$0,7 \text{ mL/menit} \cdot 0 \mu\text{M} + 0,2 \text{ mL/menit} \cdot 50 \mu\text{M} = (0,7 \text{ mL/menit} + 0,2 \text{ mL/menit}) \cdot c_3$

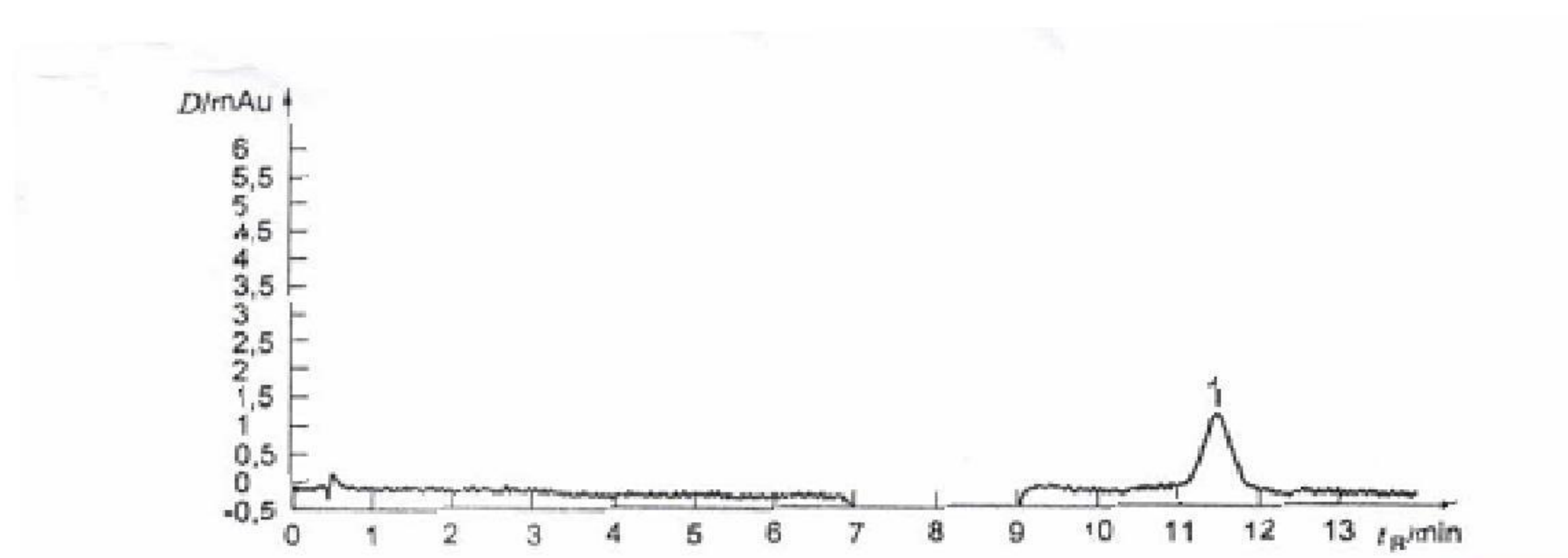
Konsentrasi amonium heptamolibdat dalam PCR module

$c_3 = 11,1 \mu\text{M}$

CATATAN larutan dengan nilai pH >1 mungkin memerlukan pemanasan larutan reaksi di unit PCR

3.23.4.3 Kondisi analisis kromatografi dan *PCR* untuk kromatogram yang ditunjukkan pada Gambar 3

| | |
|---------------------------------------|--|
| Kolom | <i>Ion exchanger</i> |
| <i>Eluent</i> | 100 mM asam sulfat |
| Volume contoh yang disuntik | 1 000 μ L |
| Laju alir <i>eluent</i> | 0,7 mL/menit |
| Pereaksi <i>PCR</i> | 0,27 M kalium iodide + 50 μ M amonium heptamolibdat |
| Aliran pereaksi <i>PCR</i> | 0,2 mL/menit |
| Kondisi pada <i>PCR reaction coil</i> | Volume: 400 μ L Suhu: suhu ruang 11,1 μ M amonium heptamolibdat 60 mM kalium iodida |
| Pendeteksi | UV, panjang gelombang 352 nm |



Keterangan gambar :

D absorbansi

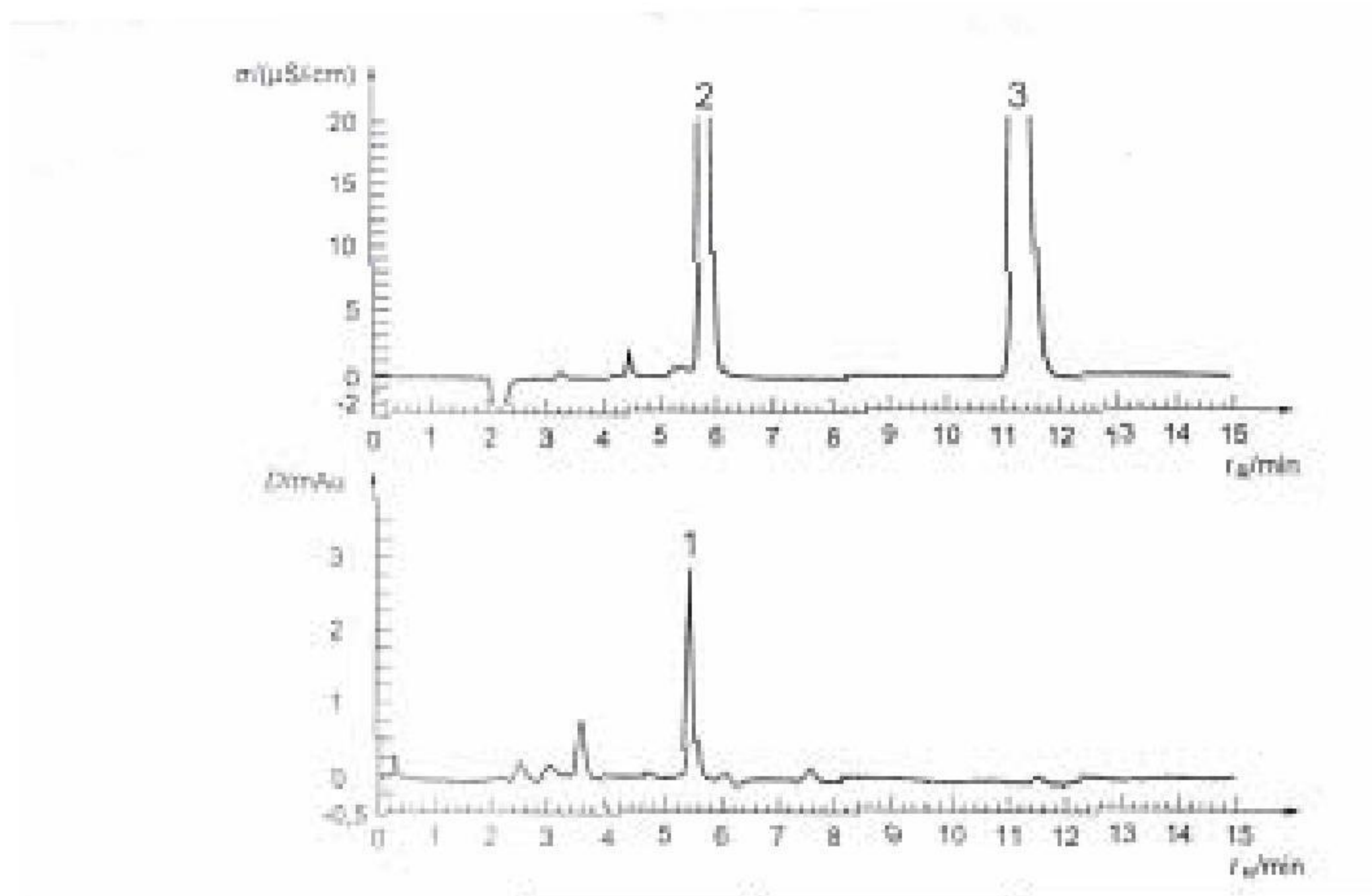
t_R waktu retensi (tergantung dari dimensi kolom : panjang, diameter dalam (ID), ukuran partikel)

| Puncak | ion | konsentrasi |
|--------|--------|---------------|
| 1 | bromat | 1,0 μ g/L |

Gambar 3 – Contoh kromatogram larutan standar sesuai dengan Standar Internasional

3.23.4.4 Keadaan kromatografik dan *PCR* untuk kromatogram yang ditunjukkan pada Gambar 4

| | |
|---------------------------------------|---|
| Pra kolom | <i>Ion exchanger</i> |
| Kolom | <i>Ion exchanger</i> |
| <i>Eluent</i> | 9 mM Na_2CO_3 |
| Volume contoh yang disuntik | 225 μ L |
| Laju alir <i>eluent</i> | 1,3 mL/menit |
| Pereaksi <i>PCR</i> | 0,27 M kalium iodida + 50 μ M amonium heptamolibdat |
| Aliran pereaksi <i>PCR</i> | 0,4 mL/menit |
| Kondisi pada <i>PCR reaction coil</i> | Volume: 375 μ L Suhu: 80 $^{\circ}\text{C}$ 12 μ M amonium heptamolibdat 64 mM kalium iodida |
| Pendeteksi | UV, pajang gelombang 352 nm |



Keterangan gambar :

δ konduktivitas

D absorban

t_R waktu retensi (tergantung dari dimensi kolom : panjang, diameter dalam (ID), ukuran partikel)

| Puncak | ion | konsentrasi |
|--------|---------|-------------------|
| 1 | bromat | 8 $\mu\text{g/L}$ |
| 2 | Klorida | 14 mg/L |
| 3 | Sulfat | 19 mg/L |

Gambar 4 – Kromatogram dari contoh uji air minum sesuai dengan Standar Internasional

CATATAN rangkaian elusi dan waktu retensi, t_R , dapat bervariasi, tergantung pada tipe kolom dan eluent

3.23.5 Pengambilan contoh dan perlakuan pendahuluan contoh

- Gunakan wadah *polyethene* yang bersih untuk pengambilan contoh;
- hindari pembentukan bromat lebih lanjut setelah pengambilan contoh dengan segera menghilangkan semua ozon yang ada dengan menambahkan 50 mg etilendiamin, $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2$, 99 % per 1 L contoh segera setelah pengambilan contoh.

CATATAN 1 logam yang ada dapat dihilangkan dengan bantuan penukar kation (*cation exchanger*) (misalnya *cartridge* dalam bentuk Na)

CATATAN 2 padatan dapat dihilangkan dengan bantuan filter membran 0,45 μm

CATATAN 3 senyawa organik dan padatan dapat dihilangkan dengan bantuan dari adsorban non-polar (misalnya SPE *cartridge*, kolom *on-line*, *dialysis on-line*)

Perlakukan larutan kalibrasi bromat dan larutan blanko dengan cara yang sama dengan larutan contoh.

3.23.6 Cara kerja

3.23.6.1 Umum

- Siapkan sistem kromatografi ion termasuk unit *PCR*, sesuai dengan instruksi manual alat;
- jalankan *eluent* dan sistem penyaluran pereaksi *PCR*. Apabila kondisi awal sudah stabil, analisis bisa dimulai;
- lakukan kalibrasi yang disyaratkan dalam 3.23.6.2. Ukur contoh dan larutan blanko sesuai dengan prosedur yang ditentukan dalam 3.23.6.3 (Pengukuran bromat)

3.23.6.2 Kalibrasi

- Suntikkan larutan kalibrasi bromat yang sudah disiapkan dari 3.23.2.s (larutan kalibrasi bromat) dan sub pasal 3.23.5 (Pengambilan contoh dan perlakuan pendahuluan contoh);
- Area/tinggi dari puncak (sinyal) sebanding dengan konsentrasi ion bromat, buat plot hubungan antara area/tinggi puncak sebagai sumbu y dan konsentrasi ion bromat sebagai sumbu x;
- sistem analisis dievaluasi baik pada saat interval pertama maupun pada interval sesudahnya sesuai dengan prinsip validasi metode analisis (salah satunya menurut ISO 8466-1 atau ISO 8466-2), buat fungsi kalibrasi untuk pengukuran, seperti berikut;
 - buat larutan kalibrasi bromat seperti yang dijelaskan di 3.23.2.s (larutan kalibrasi bromat) dan sub pasal 3.23.5 (Pengambilan contoh dan perlakuan pendahuluan contoh);
 - analisis larutan kalibrasi *chromatographically*;
 - gunakan data yang diperoleh (area puncak atau tinggi puncak) untuk menghitung garis regresi;
 - kemudian, verifikasi validitas dari fungsi kalibrasi yang ditetapkan 3.23.6.5.

3.23.6.3 Pengukuran bromat

- Setelah membuat fungsi kalibrasi, suntikkan contoh yang telah disiapkan sebelumnya (lihat sub pasal 3.23.5 (Pengambilan contoh dan perlakuan pendahuluan contoh) ke dalam kromatografi dan ukur puncak seperti dijelaskan di atas (lihat sub pasal 3.23.6/Cara kerja). Sebelum injeksi ke alat analisis, saring contoh melalui filter membran (ukuran pori 0,45 μm) dari bahan yang sesuai untuk menghilangkan partikel. Hindari terjadinya kontaminasi contoh dari membran (misalnya bilas membran dengan volume kecil contoh dan buang bagian pertama dari filtrat);
- identifikasi puncak bromat dengan membandingkan waktu retensi dengan bromat dalam larutan kalibrasi (3.23.2.s). Penyimpangan waktu retensi tidak lebih dari $\pm 10\%$ tiap *batch*.
- jika konsentrasi bromat dari contoh melebihi kisaran kalibrasi, encerkan contoh dan ulang kembali menganalisisnya;
- jika konsentrasi bromat dari contoh lebih rendah dari kisaran kalibrasi, buat fungsi kalibrasi yang terpisah untuk daerah kerja yang lebih rendah;
- jika diperkirakan akan ada gangguan matriks, gunakan metode penambahan standar (standar adisi) untuk mengkonfirmasi hasil (verifikasi puncak dengan cara membandingkan waktu retensi contoh yang ditambahkan *spike* dengan contoh asli (tanpa ditambahkan *spike*);
- Ukur larutan blanko dengan cara yang sama.

CATATAN karena menggunakan kalium iodida (KI) yang sangat rentan terhadap oksidasi, dan menghasilkan larutan warna kekuningan, maka semua bagian *PCR* dapat dibilas (misalnya koil reaksi dan sel detektor) dengan air setelah selesai analisis, dan hindarkan keluarnya cairan dari koil reaksi karena gravitasi setelah sistem dimatikan.

3.23.6.4 Menghilangkan klorit

Jika kromatogram bromat menunjukkan gangguan yang disebabkan oleh klorit, hilangkan klorit dengan cara sebagai berikut:

- Tempatkan 10 mL contoh dalam 20 mL gelas piala, atur pH 5 sampai 6 dengan menambahkan asam sulfat $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1 \text{ M}$ (A.3.2.c), tambah 40 μL larutan besi (II), Fe^{2+} *densitas* (ρ) = 1 000 mg/L (A.3.2.p), campur dan biarkan bereaksi selama 10 menit. Saring larutan melewati filter membran (ukuran pori 0,45 μm) untuk menghilangkan endapan besi hidroksida. Kemudian teruskan hasil saringan (filtrat) melalui *cation exchanger cartridges* yang dikondisikan dalam bentuk Na pada kecepatan aliran sekitar 1 mL/menit untuk menghilangkan kelebihan besi yang terlarut. Buang 3 mL pertama hasil saringan, kumpulkan volume yang tepat untuk dianalisis. Contoh yang telah diberi perlakuan stabil selama 24 jam;
- Tambahkan *spike* ke dalam 10 mL contoh kedua dengan bromat pada tingkat mendekati dua kali lipat dari bromat yang ditentukan dalam contoh asli. Perlakukan contoh yang telah diberi *spike* ini dengan cara yang sama seperti dijelaskan di atas. Perolehan kembali bromat harus berada dalam kisaran 80 % sampai 120 %.
- Perlakukan larutan kalibrasi dan larutan blanko dalam cara yang sama seperti larutan contoh.

3.23.6.5 Pemeriksaan validitas fungsi kalibrasi

Dalam rangka verifikasi validitas berkelanjutan dari fungsi kalibrasi, ukur beberapa larutan standar dengan konsentrasi bromat yang berbeda yang masuk dalam 1/3 daerah kerja di atas batas bawah dan 1/3 daerah kerja di bawah batas atas. Kerjakan sesuai prosedur (lihat sub pasal 3.23.6.1/umum) dan sedikitnya setelah setiap seri contoh, dalam beberapa kasus setelah 20 pengukuran contoh. Perolehan kembali harus berada antara 90 % sampai 110 % dari nilai nominal. Bila perlu lakukan kalibrasi ulang.

3.23.7 Perhitungan

Hitung konsentrasi massa, dalam mikrogram per liter atau miligram per liter, untuk bromat dalam larutan dengan menggunakan daerah puncak atau tinggi puncak.

3.23.8 Pernyataan hasil

Hasil dilaporkan ke maksimal dua angka penting.

Contoh

| | |
|-----------------------------|----------------------|
| Bromat (BrO_3^-) | 5,1 $\mu\text{g/L}$ |
| Bromat (BrO_3^-) | 0,62 $\mu\text{g/L}$ |

3.24 Kadar karbon dioksida (CO_2) bebas

3.24.1 Prinsip

CO_2 bebas bereaksi dengan natrium karbonat atau natrium hidroksida membentuk natrium bikarbonat. Berakhirnya reaksi ditunjukkan oleh perubahan potensial atau munculnya warna merah muda oleh adanya indikator fenolftalein pada kesetaraan pH 8,3. Larutan natrium bikarbonat (NaHCO_3) 0,01 N yang mengandung indikator fenolftalein pada volume tertentu merupakan standar untuk memperoleh warna yang sesuai pada titik akhir titrasi.

3.24.2 Peralatan

- a) *Titrat*;
- b) Wadah titrasi (*titration vessel*);
- c) *magnetic stirrer*;
- d) desikator;
- e) pipet ukur;
- f) labu ukur 1 000 mL, 200 mL dan 100 mL;
- g) buret, 50 mL, 25 mL, 10 mL;
- h) botol *polyolefin* 1 L;

3.24.3 Pereaksi

- a) Air bebas karbondioksida: siapkan seluruh larutan stok, larutan standar dan air untuk pengenceran menggunakan air suling atau air deionisasi yang telah dididihkan selama 15 menit dan didinginkan pada suhu kamar. Disyaratkan pH akhir dari air $\geq 6,0$ dan konduktivitas $< 2 \mu\text{mhos/cm}$
- b) Larutan kalium hidrogen ftalat (KHP), $\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4 \pm 0,05 \text{ N}$: gerus 15 g sampai 20 g standar primer KHP menjadi sekitar 100 mesh dan keringkan pada 120°C selama 2 jam. Dinginkan dalam desikator. Timbang ($10,0 \pm 0,5 \text{ g}$), larutkan dan pindahkan ke dalam labu ukur 1 L, selanjutnya diencerkan sampai 1 000 mL
- c) Standarisasi natrium hidroksida, 0,1 N: siapkan larutan kira-kira 0,1 N seperti yang ditunjukkan di bagian persiapan pereaksi. Standarisasi dilakukan dengan mentitrasi 40,00 mL larutan KHP (b), menggunakan buret 25 mL. Gunakan indikator fenolftalein alkohol, titrasi sampai mencapai titik perubahan warna ($\pm \text{pH } 8,7$). Hitung normalitas NaOH:

$$\text{Normalitas} = \frac{A \times B}{204,2 \times C}$$

Keterangan :

- A = g KHP yang ditimbang ke dalam labu 1 L
- B = mL larutan KHP yang digunakan untuk titrasi
- C = mL larutan NaOH yang digunakan

Gunakan normalitas yang dihitung, atau normalitasnya diatur hingga 0,100 0 N; 1 mL = 5,00 mg CaCO_3 .

- d) Larutan indikator fenolftalein dalam alkohol, sebagai indikator pH 8,3

3.24.4 Cara Kerja

3.24.4.1 Penyimpanan contoh

Simpan contoh dalam refrigerator ($2^\circ\text{C} - 10^\circ\text{C}$) sampai contoh siap diuji. Lakukan pengujian laboratorium sesegera mungkin untuk memperkecil efek dari perubahan CO_2 .

3.24.4.2 Volume contoh

- a) Untuk contoh yang memiliki keasaman kurang dari 1 000 mg/L (sebagai CaCO_3), pilih volume dengan keasaman kurang dari setara 50 mg CaCO_3 dan titrasi dengan 0,02 N NaOH.
- b) Untuk contoh yang memiliki keasaman lebih dari 1 000 mg/L (sebagai CaCO_3), gunakan satu bagian contoh dengan keasaman kurang dari setara 250 mg CaCO_3 dan titrasi

dengan 0,1 N NaOH, jika diperlukan lakukan titrasi pendahuluan untuk menentukan volume contoh yang optimal.

3.24.4.3 Penentuan kandungan CO₂ bebas

- Atur suhu contoh hingga diperoleh suhu kamar, dan pipet 100 mL contoh tersebut ke dalam labu atau botol;
- Tambahkan 0,2 mL larutan indikator fenolftalein dan titrasi dengan NaOH di atas permukaan berwarna putih, sampai terjadi perubahan warna merah muda (*light pink*) (pada titik ekuivalen pH 8,3).

3.24.4.4 Perhitungan

$$\text{mg CO}_2/\text{L} = \frac{A \times N \times 44\,000}{\text{mL contoh}}$$

Keterangan:

A = mL NaOH

N = normalitas NaOH

3.24.4.5 Presisi dan Bias

Ketelitian (presisi) dan penyimpangan (bias) dari metode titrimetrik berada pada $\pm 10\%$ dari konsentrasi CO₂ yang diketahui.

3.25 Kadar oksigen (O₂) terlarut secara iodometri (modifikasi azida)

3.25.1 Prinsip

Oksigen terlarut bereaksi dengan ion mangan (II) dalam suasana basa menjadi hidroksida mangan dengan valensi yang lebih tinggi (Mn IV). Dengan adanya ion iodida (I⁻) dalam suasana asam, ion mangan (IV) akan kembali menjadi ion mangan (II) dengan membebaskan iodin (I₂) yang setara dengan kandungan oksigen terlarut. Iodin yang terbentuk kemudian dititrasi dengan natrium tiosulfat dengan indikator amilum.

3.25.2 Peralatan

- Botol *Winkler*;
- buret mikro 2 mL atau digital buret 25 mL;
- pipet volume 5 mL; 10 mL dan 50 mL;
- pipet ukur 5 mL;
- Erlenmeyer* 125 mL, 150 mL;
- gelas piala 400 mL; dan
- labu ukur 1 000 mL;

3.25.3 Pereaksi

- Larutan mangan sulfat
Larutkan 480 g MnSO₄·4H₂O, 400 g MnSO₄·2H₂O atau 364 g MnSO₄·H₂O dengan air suling ke dalam labu ukur 1 000 mL, tepatkan sampai tanda tera;

- b) Pereaksi alkali-iodida-azida
- untuk contoh jenuh atau kurang jenuh: larutkan 500 g NaOH atau 700 g KOH dan 135 g NaI atau 150 g KI dengan air suling, encerkan sampai 1 000 mL. Tambahkan 10 g NaN₃ yang dilarutkan dalam 40 mL air suling;
 - untuk contoh yang lewat jenuh: Larutkan 10 g NaN₃ dalam 500 mL air suling. Tambahkan 480 g NaOH dan 750 g NaI dan aduk sampai larut;
- c) Larutan kanji (amilum/kanji)
- Larutkan 2 g amilum dan 0,2 g asam salisilat (HOC₆H₄COOH) sebagai pengawet dalam 100 mL air suling yang dipanaskan (mendidih);
- d) Asam sulfat (H₂SO₄) pekat, 1 mL setara dengan sekitar 3 mL pereaksi alkali-yodida-azida;
- e) Titran standar natrium tiosulfat (Na₂S₂O₃·5H₂O): Timbang 6,205 g Na₂S₂O₃·5H₂O dan larutkan dengan air suling yang telah dididihkan (bebas oksigen). Tambahkan 1,5 mL NaOH 6 N atau 0,4 g NaOH padat dan encerkan sampai 1 000 mL. Lakukan standardisasi dengan larutan bi-iodat atau larutan kalium dikromat (K₂Cr₂O₇);
- f) Larutan standar kalium bi-iodat, KH(IO₃)₂ 0,002 1 M: larutkan 812,4 mg KH(IO₃)₂ dalam air suling dan encerkan sampai 1 000 mL;
- g) Larutan standar kalium dikromat (K₂Cr₂O₇) 0,025N
- Larutkan 1,225 9 g K₂Cr₂O₇ (yang telah dikeringkan pada 150 °C selama 2 jam) dengan air suling dan tepatkan sampai 1 000 mL;
- h) Standardisasi: standardisasi Natrium tiosulfat dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu Standardisasi dengan larutan bi-iodat atau larutan kalium dikromat (K₂Cr₂O₇).
- 1) Standardisasi dengan larutan bi-iodat: Larutkan lebih kurang 2 g KI, bebas dari iodat, dalam labu *Erlenmeyer* dengan 100 sampai 150 mL air suling. Tambahkan 1 mL H₂SO₄ 6 N atau beberapa tetes H₂SO₄ pekat dan 20,00 mL larutan standar bi-iodat. Encerkan sampai 200 mL dan titrasi iodin yang dibebaskan dengan titran tiosulfat, tambahkan larutan kanji sebagai penunjuk akhir titrasi sampai terbentuk warna kuning muda. Ketika larutan berada dalam kekuatan yang sama, diperlukan 20,00 mL Na₂S₂O₃ 0,025 M. Jika tidak, sesuaikan larutan Na₂S₂O₃ menjadi 0,025 M. Hitung normalitas larutan Na₂S₂O₃ dengan rumus sebagai berikut:

$$N - \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = \frac{N_2 \times V_2}{V_1}$$

Keterangan:N = normalitas Na₂S₂O₃V₁ = mL Na₂S₂O₃V₂ = mL kalium bi-iodat yang digunakanN₂ = normalitas larutan kalium bi-iodat

Standardisasi dengan larutan kalium dikromat (K₂Cr₂O₇): larutkan 4,904 g K₂Cr₂O₇ (pa) dalam air suling dan larutkan hingga 1 000 mL untuk mendapatkan larutan 0,1000 N. simpan di botol tertutup. Ke dalam 80 mL air suling, tambahkan sambil diaduk 1 mL H₂SO₄ pekat, 10,00 mL 0,100 0 N K₂Cr₂O₇ dan 1 g KI, aduk dan simpan di tempat gelap selama 6 menit. Titrasi dengan 0,1 N Na₂S₂O₃ sampai terjadi perubahan warna. Hitung normalitas larutan Na₂S₂O₃ dengan rumus sebagai berikut:

$$N = \frac{N_2 \times V_2}{V_1}$$

Keterangan:N = normalitas Na₂S₂O₃V₁ = mL Na₂S₂O₃V₂ = mL K₂Cr₂O₇ yang digunakanN₂ = normalitas larutan K₂Cr₂O₇

3.25.4 Cara kerja

- Sediakan botol *Winkler* dan masukkan contoh uji ke dalam botol *Winkler* sampai meluap, hati-hati jangan sampai terjadi gelembung udara, kemudian tutup rapat jangan sampai ada gelembung udara didalam botol;
- Lakukan pengujian contoh uji segera setelah contoh diambil;
- Ambil contoh yang telah disiapkan;
- Tambahkan 1 mL larutan MnSO_4 dan 1 mL pereaksi alkali-iodida-azida dengan ujung pipet tepat di atas permukaan larutan;
- Tutup hati-hati untuk menghilangkan gelembung udara dan campur dengan membalik botol beberapa menit;
- Biarkan gumpalan mengendap 5 menit sampai 10 menit, menghasilkan supernatan jernih di atas endapan mangan hidroksida;
- Tambahkan 1,0 mL H_2SO_4 pekat, tutup dan campur dengan membalik botol beberapa kali sampai endapan larut sempurna;
- Pipet 50 mL, masukkan ke dalam *Erlenmeyer* 150 mL;
- Titrasi dengan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ sampai terbentuk warna kuning pucat. Hentikan titrasi. Selanjutnya tambahkan indikator amilum/kanji beberapa tetes dan lanjutkan titrasi sampai warna biru tepat hilang.

CATATAN Penambahan volume pereaksi diatas berdasarkan botol *Winkler* 250 mL sampai dengan 300 mL, bila menggunakan botol *Winkler* dengan volume yang lain agar dihitung secara proporsional

3.25.5 Perhitungan

$$\text{Oksigen terlarut (mg/L)} = \frac{V \times N \times 8\,000 \times F}{50}$$

Keterangan:

V = mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

N = normalitas $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

F = faktor (volume botol dibagi volume botol dikurangi volume pereaksi MnSO_4 dan alkali iodida azida pada langkah A.5.4.d)

Contoh :

Untuk total 2 mL (1 mL MnSO_4 + 1 mL Alkali iodida azida) dalam botol *winkler* 250 mL maka $F = 50 \times 250 / (250 - 2) = 12\,500 / 248 = 50,40$ mL

3.25.6 Presisi dan Bias

Ketelitian (presisi) dan penyimpangan (bias) pada penentuan oksigen terlarut dengan metode iodometri dapat diekspresikan dengan suatu standar deviasi ± 20 $\mu\text{g/L}$ dalam air suling.

3.26 Cemaran logam

3.26.1 Timbal (Pb)

3.26.1.1 Metode Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) Tungku karbon

3.26.1.1.1 Prinsip

Analisis cemaran logam Pb dengan SSA menggunakan lampu katoda Pb berdasarkan pada penyerapan energi radiasi oleh atom-atom Pb pada tingkat energi dasar dengan atomisasi tungku karbon.

3.26.1.1.2 Peralatan

- SSA tungku karbon, terkalibrasi;
- pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL, terkalibrasi;
- saringan membran 0,45 µm;
- labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1 000 mL, terkalibrasi;
- pipet ukur 10 mL dan 100 mL, terkalibrasi;
- tabung reaksi 20 mL;
- gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- penangas listrik.

3.26.1.1.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam;
Air suling yang telah mengalami dua kali penyulingan.
- Asam nitrat, HNO₃ p.a;
- Larutan induk Pb 1 000 mg /L;
- Larutan baku Pb 10 mg/L;
Pipet 1 mL larutan baku Pb 1 000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambah air suling bebas logam yang mengandung HNO₃ (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- Larutan Standar Pb; 0 µg/L; 10 µg/L ; 40 µg/L dan 80µg/L;
Pipet masing-masing 0 mL; 0,10 mL; 0,20 mL; 0,40 mL dan 0,80 mL larutan baku Pb 10 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan air suling bebas logam yang mengandung HNO₃ (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

3.26.1.1.4 Persiapan contoh

- a) Saring larutan contoh 50 mL sampai 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 µm.
- b) Asamkan contoh sampai pH < 2 dengan HNO₃ p.a
- c) Bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL tambahkan 5 mL HNO₃ p.a.dan batu didih kemudian uapkan di atas penangas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL.
- d) Pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO₃ (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- e) Contoh siap diuji.

3.26.1.1.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh dengan menggunakan SSA tungku karbon.

3.26.1.1.6 Perhitungan

Hitung kadar Pb dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

3.26.1.2 Metode uji secara inductively coupled plasma (ICP)

Lihat 3.26.8.

3.26.2 Tembaga (Cu)

3.26.2.1 Metode Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) Tungku karbon

3.26.2.1.1 Prinsip

Analisis cemaran logam Cu dengan SSA menggunakan lampu katoda Cu berdasarkan pada penyerapan energi radiasi oleh atom-atom Cu pada tingkat energi dasar dengan atomisasi tungku karbon.

3.26.2.1.2 Peralatan

- SSA tungku karbon terkalibrasi;
- pipet mikro 0,5 mL, 1 mL, dan 10 mL terkalibrasi;
- saringan membran 0,45 μm ;
- labu ukur 50 mL, 100 mL, 1 000 mL terkalibrasi;
- pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- tabung reaksi 20 mL;
- gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- penangas listrik.

3.26.2.1.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam;
Air suling yang telah mengalami dua kali penyulingan.
- Asam nitrat, HNO_3 p.a.;
- Larutan induk Cu 1 000 mg/L;
- Larutan baku Cu 1 mg/L;
Pipet 1 mL larutan standar Cu 1 000 mL/L ke dalam labu ukur 1 000 mL tambah air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- Larutan standar Cu; 0 $\mu\text{g/L}$; 5 $\mu\text{g/L}$; 10 $\mu\text{g/L}$; 15 $\mu\text{g/L}$ dan 20 $\mu\text{g/L}$;
Pipet masing-masing 0 mL; 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL dan 2 mL larutan baku Cu 1 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

3.26.2.1.4 Persiapan contoh

- a) Saring larutan contoh 50 mL sampai 100 mL menggunakan saringan membran 0,45 μm .
- b) Asamkan contoh sampai $\text{pH} < 2$ dengan HNO_3 p.a.
- c) Bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas penangas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL - 20 mL.
- d) Pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- e) Contoh siap diuji.

3.26.2.1.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh dengan menggunakan SSA tungku karbon.

3.26.2.1.6 Perhitungan

Hitung kadar tembaga dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

3.26.2.2 Metode uji secara inductively coupled plasma (ICP)

Lihat 3.26.8.

3.26.3 Kadmium (Cd)

3.26.3.1 Metode Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) Tungku karbon

3.26.3.1.1 Prinsip

Analisis cemaran logam kadmium (Cd) dengan SSA menggunakan lampu katoda Cd berdasarkan pada penyerapan energi radiasi oleh atom-atom yang berbeda-beda pada tingkat tenaga dasar.

3.26.3.1.2 Peralatan

- SSA tungku karbon terkalibrasi;
- pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi;
- saringan membran 0,45 μ m;
- labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1 000 mL terkalibrasi;
- pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- tabung reaksi 20 mL;
- gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- penangas listrik.

3.26.3.1.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam;
Air suling yang telah mengalami dua kali penyulingan.
- Asam nitrat, HNO₃ p.a;
- Larutan induk Cd 1 000 mg /L;
- Larutan baku Cd 1 mg/L;
Pipet 1 mL larutan baku Cd 1 000 mL/L kedalam labu ukur 1 000 mL tambah air suling bebas logam yang mengandung HNO₃ (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- Larutan standar Cd; 0 μ g/L; 2,5 μ g/L ; 5 μ g/L; 7,5 μ g/L dan 10 μ g/L;
Pipet masing-masing 0 mL; 0,25 mL; 0,5 mL; 0,75 mL dan 1 mL larutan baku Cd 1 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan air suling bebas logam yang mengandung HNO₃ (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

3.26.3.1.4 Persiapan contoh

- a) Saring larutan contoh 50 mL sampai 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 μ m.
- b) Asamkan contoh sampai pH < 2 dengan HNO₃ p.a.
- c) Bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL tambahkan 5 mL HNO₃ p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas penangas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL.

- d) Pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
e) Contoh siap uji.

3.26.3.1.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh menggunakan SSA tungku karbon.

3.26.3.1.6 Perhitungan

Hitung kadar Cd dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

3.26.3.2 Metode uji secara inductively coupled plasma (ICP)

Lihat 3.26.8.

3.26.4 Raksa (Hg)

3.26.4.1 Prinsip

Analisis logam Hg dengan SSA secara uap dingin menggunakan lampu katoda Hg berdasarkan pada penyerapan energi radiasi oleh asam-asam yang berbeda-beda pada tingkat dasar.

3.26.4.2 Peralatan

- SSA dan generator hidrid terkalibrasi;
- pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi;
- saringan membran 0,45 μm ;
- labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1 000 mL terkalibrasi;
- pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- tabung reaksi 20 mL;
- gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- penangas air ;
- erlenmeyer.

3.26.4.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam;
Air suling yang telah mengalami dua kali penyulingan.
- Asam nitrat HNO_3 p.a;
- Asam sulfat H_2SO_4 p.a;
- Larutan kalium permanganat, KMnO_4 , 5%;
Larutkan 50 g KMnO_4 dalam labu ukur 1 L dengan air suling, encerkan dan impitkan sampai tanda garis.
- Larutan kalium persulfat, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, 5 %;
Larutkan 50 g $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ dalam labu ukur 1 L dengan air suling, encerkan dan impitkan . sampai tanda garis.

- Larutan Natrium klorida hidroksil-amin sulfat, $(\text{NH}_2\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$.
Larutkan 120 g NaCl dan 120 g $(\text{NH}_2\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ dalam labu ukur 1 L dengan air suling, encerkan sampai tanda garis.
- Larutan Natrium borohidrida NaBH_4 ;
Larutkan 8 g NaBH_4 dengan 200 mL NaOH 0,1 N, larutan ini harus segar.
- Larutan induk Hg 1 000 mg/L;
- Larutan baku Hg 1 mg/L;
Pipet 1 mL larutan induk Hg 1 000 mg/L ke dalam labu ukur 1 000 mL tambahkan air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- Larutan standar Hg. 0 $\mu\text{g/L}$; 1 $\mu\text{g/L}$; 2 $\mu\text{g/L}$; 3 $\mu\text{g/L}$; 4 $\mu\text{g/L}$ dan 5 $\mu\text{g/L}$;
Pipet masing-masing 0 mL; 0,1 mL; 0,2 mL; 0,3 mL; 0,4 mL; dan 0,5 mL larutan baku Hg 1 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis. Larutan standar harus selalu segar.

3.26.4.4 Cara kerja

- a) Ukur dengan teliti 100 mL contoh dan air suling bebas logam sebagai blanko ke dalam labu Erlenmeyer 250 mL.
- b) Tambahkan 5 mL H_2SO_4 pa, 2,5 mL HNO_3 dan 15 mL larutan KMnO_4 , ke dalam contoh larutan standar dan blanko, biarkan paling sedikit 15 menit.
- c) Tambah 8 mL larutan $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ dan panaskan selama 2 jam dalam penangas air pada suhu 95°C .
- d) Dinginkan pada suhu ruang dan tambah 6 mL larutan $(\text{NH}_2\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$ untuk mengurangi kelebihan permanganat.
- e) Periksa larutan standar dan contoh dengan menggunakan SSA.

3.26.4.5 Perhitungan

Hitung kadar raksa dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

3.26.5 Cemarkan arsen (As)

3.26.5.1 Metode Spektrofotometer Serapan Atom (SSA) Tungku karbon

3.26.5.1.1 Prinsip

Analisis cemarkan As dengan SSA menggunakan lampu katoda As berdasarkan pada penyerapan energi radiasi oleh asam-asam yang berbeda-beda pada tingkat dasar.

3.26.5.1.2 Peralatan

- SSA tungku karbon terkalibrasi;
- pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi;
- saringan membran 0,45 μm ;
- labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1 000 mL terkalibrasi;
- pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- tabung reaksi 20 mL;
- gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- pemanas listrik.

3.26.5.1.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam;
Air yang telah mengalami 2 kali penyulingan.
- Asam nitrat, HNO_3 p.a;
- Larutan induk arsen 1 000 mg/L;
- Larutan baku arsen 1 mg/L;
Pipet 1 mL larutan baku arsen 1 000 mg/L ke dalam labu ukur 1 000 mL tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. 5 mL encerkan dengan air suling bebas logam sampai tanda garis.
- Larutan standar arsen 2,5 $\mu\text{g/L}$; 5 $\mu\text{g/L}$; 7,5 $\mu\text{g/L}$; dan 10 $\mu\text{g/L}$;
Pipet masing-masing 0 mL; 0,25 mL; 0,50 mL; 0,75 mL dan 1,00 mL larutan baku arsen 1 mg/L kedalam labu ukur 100 mL tambahkan air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

3.26.5.1.4 Persiapan contoh

- a) Saring larutan contoh 50 mL sampai 100 mL menggunakan saringan membran 0,45 μm .
- b) Asamkan contoh sampai pH < 2 dengan HNO_3 p.a.
- c) Bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150 mL tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas penangas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL.
- d) Pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- e) Contoh siap diuji

3.26.5.1.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh dengan menggunakan SSA tungku karbon.

3.26.5.1.6 Perhitungan

Hitung kadar cemaran As dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

3.26.5.2 Metode SSA secara Natrium Borohidrid

3.26.5.2.1 Prinsip

Analisis cemaran As dengan SSA menggunakan lampu katoda As berdasarkan pada penyerapan energi radiasi oleh atom-atom yang berbeda-beda pada tingkat dasar.

3.26.5.2.2 Peralatan

- SSA dan generator uap hidrid terkalibrasi;
- pipet mikro 0,5 mL, 1 mL dan 10 mL terkalibrasi;
- saringan membran 0,45 μm ;
- labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1 000 mL terkalibrasi;
- pipet ukur 10 mL dan 100 mL terkalibrasi;
- tabung reaksi 20 mL;
- gelas piala 150 mL dan 500 mL;
- pemanas listrik.

3.26.5.2.3 Pereaksi

- Air suling bebas logam ;
Air yang telah mengalami 2 kali penyulingan.
- Asam nitrat, HNO_3 p.a;
- Larutan natrium borohidrida, NaBH_4 .
larutkan 8 g NaBH_4 dengan 200 mL NaOH 0,1 N, larutan ini harus segar.
- Larutan induk arsen 1 000 mg/L;
- Larutan baku arsen 1 mg/L;
Pipet 1 mL larutan baku arsen 1 000 mg/L ke dalam labu ukur 1 000 mL tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. encerkan dengan air suling bebas logam sampai tanda garis.
- Larutan standar arsen 2,5 $\mu\text{g/L}$; 5 $\mu\text{g/L}$; 7,5 $\mu\text{g/L}$; dan 10 $\mu\text{g/L}$.
Pipet masing-masing 0 mL; 0,25 mL; 0,50 mL; 0,75 mL dan 1,00 mL larutan baku arsen 1 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL, tambahkan air suling bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.

3.26.5.2.4 Persiapan contoh

- a. Saring larutan contoh 50 mL sampai 100 mL dengan menggunakan saringan membran 0,45 μm
- b. Asamkan contoh sampai $\text{pH} < 2$ dengan HNO_3 p.a.
- c. Bila terjadi endapan, pipet 100 mL contoh yang diasamkan ke dalam gelas piala 150mL tambahkan 5 mL HNO_3 p.a. dan batu didih kemudian uapkan di atas penangas listrik sampai larutan jernih dan volumenya kira-kira 10 mL - 20 mL.
- d. Pindahkan contoh ke dalam labu ukur 100 mL, dinginkan dan tambahkan air bebas logam yang mengandung HNO_3 (1,5 mL/L) sampai tanda garis.
- e. Contoh siap diuji.

3.26.5.2.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh dengan menggunakan SSA generator uap hidrid.

3.26.5.2.6 Perhitungan

Hitung kadar cemaran As dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier.

3.26..5.3 Metode uji secara inductively coupled plasma (ICP)

Lihat 3.26.8.

3.26.6 Antimon (Sb)

3.26.6.1 Metode Spektrofotometer Serapan Atom (SSA)-tungku karbon

3.26.6.1.1 Prinsip

Analit logam antimon (Sb) dalam tungku karbon diubah menjadi bentuk atomnya, menyerap energi radiasi elektromagnetik yang berasal dari lampu katoda dan besarnya serapan berbanding lurus dengan kadar analit.

3.26.6.1.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA)-tungku karbon;
- b) lampu katoda berongga (*hollow-cathode lamp*);
- c) gelas piala 250 mL;
- d) *graphite tube*;
- e) pipet volumetrik 10 mL dan 50 mL;
- f) labu ukur 50 mL; 100 mL dan 1 000 mL;
- g) kaca arloji;
- h) pemanas listrik;
- i) seperangkat alat saring vakum.

3.26.6.1.3 Pereaksi

- a) Air suling bebas logam - air suling yang telah mengalami 2 kali penyulingan
- b) Asam klorida, HCl *p.a* pekat dan HCl 1 + 1
- c) Asam nitrat, HNO₃ *p.a* pekat dan HNO₃ 1 + 1
- d) Larutan stok *matrix modifier* (pilih salah satu sesuai dengan petunjuk SSA yang digunakan) dapat dibuat sebagai berikut:
 1. Magnesium nitrat, 10 000 mg Mg/L: larutkan 10,5 g Mg(NO₃)₂·6H₂O dalam air lalu encerkan sampai 100 mL.
 2. Nikel nitrat, 10 000 mg Ni/L: larutkan 4,96 g Ni(NO₃)₂·6H₂O dalam air lalu encerkan sampai 100 mL
 3. Palladium nitrat, 4 000 mg Pd/L: larutkan 8,89 g Pd(NO₃)₂·H₂O dalam air lalu encerkan sampai 1 L
 4. Asam sitrat, 4%: larutkan 40 g asam sitrat dalam air lalu encerkan sampai 1 liter.
- e) *matrix modifier* disesuaikan dengan pilihan di A.3.1.1.3 d) (diasumsikan 10 µL *modifier*/10 µL contoh)
 - 1) 1 500 mg Pd/L (lihat d.3) + 1 000 mg Mg(NO₃)₂/L (lihat d.1) atau
 - 2) 500 sampai 2 000 mg Pd/L (lihat d.3) + senyawa pereduksi (umumnya digunakan asam sitrat 1% sampai 2%, atau dapat digunakan juga asam askorbat pada konsentrasi tersebut)
 - 3) 50 mg Ni/L (lihat d.2)
- f) Larutan stok standar Antimon (Sb): larutkan 0,266 9 g K(SbO)C₄H₄O₆ dalam air, tambahkan 10 mL 1 + 1 HCl dan encerkan sampai 1 000 mL dengan air. 1,00 mL = 100 µg Sb

3.26.6.1.4 Persiapan contoh

- a) Saring 100 mL contoh dengan menggunakan saringan membran 0,45 µm;
- b) awetkan contoh dengan menambahkan HNO₃ *p.a.* pekat sampai pH < 2 (1,5 mL HNO₃/L cukup untuk air minum)
- c) destruksi seluruh contoh sebelum menganalisis logam total dengan cara sebagai berikut: pipet 100 mL contoh yang diawetkan (b) ke dalam gelas piala 250 mL, tambahkan 5 mL HNO₃ *p.a.* pekat dan batu didih, tutup dengan gelas arloji kemudian uapkan di atas penangas listrik, bila perlu tambahkan lagi HNO₃ *p.a.* pekat sampai destruksi selesai dan larutan jernih, dengan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL;
- d) Bilas kaca arloji dan masukkan air bilasannya ke dalam gelas piala, kemudian pindahkan contoh ke dalam labu 100 mL;
- e) Bilas gelas piala dan masukkan air bilasannya ke dalam labu 100 mL, kemudian tepatkan sampai tanda garis dengan air suling bebas logam;
- f) Contoh siap diuji.

3.26.6.1.5 Cara Kerja

Periksa larutan standar dan contoh pada alat SSA-tungku karbon. Larutan standar diperiksa pada berbagai konsentrasi yang mencakup konsentrasi antimon dalam contoh.

3.26.6.1.6 Perhitungan

Hitung kadar Antimon (Sb) dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan regresi linier. Konsentrasi logam dihitung sebagai berikut :

$$Sb \text{ (mg/L)} = C \times Fp$$

Keterangan:

C = Adalah konsentrasi (mg/L) yang didapat dari kurva kalibrasi

Fp = Faktor pengenceran.

3.26.7 Nikel (Ni)

3.26.7.1 Metode Spektrofotometer Serapan Atom (SSA)

3.26.7.1.1 Prinsip

Analit logam nikel (Ni) dalam nyala udara asetilen diubah menjadi bentuk atomnya, menyerap energi radiasi elektromagnetik yang berasal dari lampu katoda dan besarnya serapan berbanding lurus dengan kadar analit.

3.26.7.1.2 Peralatan

- a) Spektrofotometer Serapan Atom (SSA)-nyala;
- b) lampu katoda berongga (*hollow-cathode lamp*);
- c) gelas piala 250 mL;
- d) pipet volumetrik 10 mL dan 50mL;
- e) labu ukur 50 mL; 100 mL dan 1 000 mL;
- f) gelas arloji;
- g) pemanas listrik;
- h) seperangkat alat saring vakum;

3.26.7.1.3 Pereaksi

- a) Air suling bebas logam - air suling yang telah mengalami 2 kali penyulingan;
- b) asam nitrat (HNO₃) pekat *pa*;
- c) larutan stok standar nikel (Ni): larutkan 0,100 0 g logam Ni dalam 10 mL HNO₃ pekat panas, dinginkan dan encerkan sampai 1 000 mL dengan air. 1,00 mL = 100 µg Ni

3.26.7.1.4 Persiapan contoh

- a) Saring 100 mL contoh dengan menggunakan saringan membran 0,45 µm;
- b) awetkan contoh dengan menambahkan HNO₃ *p.a.* pekat sampai pH < 2 (1,5 mL HNO₃/L cukup untuk air minum)
- c) Destruksi seluruh contoh sebelum menganalisis logam total dengan cara sebagai berikut: pipet 100 mL contoh yang diawetkan (b) ke dalam gelas piala 250 mL, tambahkan
- d) 5 mL HNO₃ *p.a.* pekat dan batu didih, tutup dengan gelas arloji kemudian uapkan di atas penangas listrik, bila perlu tambahkan lagi HNO₃ *p.a.* pekat sampai destruksi selesai dan larutan jernih, dengan volumenya kira-kira 10 mL sampai 20 mL;

- e) Bilas gelas arloji dan masukkan air bilasannya ke dalam gelas piala, kemudian pindahkan contoh ke dalam labu 100 mL;
- f) Bilas gelas piala dan masukkan air bilasannya ke dalam labu 100 mL, kemudian tepatkan sampai tanda garis dengan air suling bebas logam;
- g) Contoh siap diuji.

3.26.7.1.5 Cara kerja

Periksa larutan standar dan contoh menggunakan Spektrofotometer Serapan Atom (SSA)-nyala. Larutan standar diperiksa pada berbagai konsentrasi yang mencakup konsentrasi nikel dalam contoh.

3.26.7.1.6 Perhitungan

Hitung kandungan logam Ni dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier. Konsentrasi logam dihitung sebagai berikut :

$$\text{Ni (mg/L)} = C \times F_p$$

Keterangan:

C = Adalah konsentrasi (mg/L) yang didapat dari kurva kalibrasi

F_p = Faktor pengenceran.

3.26.7.2 Metode uji secara inductively coupled plasma (ICP)

Lihat 3.26.8.

3.26.8 Metode uji total logam secara inductively coupled plasma (ICP)

3.26.8.1 Prinsip

Analisa cemaran logam Fe, Mn, Pb, Cd, Cu, Cr, Co, Ni, Zn, Se, Ba, B, As dan Al dengan ICP berdasarkan pada ionisasi persentasi yang tinggi dari atom yang dihasilkan oleh plasma yang bersuhu tinggi.

3.26.8.2 Ruang lingkup

Metode uji ini meliputi prosedur pengujian kadar cemaran logam Fe, Mn, Pb, Cd, Cu, Cr, Co, Ni, Zn, Se, Ba, B, As dan Al dalam contoh AMDK, Air dan limbah cair secara ICP.

3.26.8.3 Peralatan

- 1) ICP, terkalibrasi
- 2) Pipet mikro 0,5 mL , 1 mL dan 10 mL, terkalibrasi
- 3) Saringan membran 0,45 µm
- 4) Labu ukur 50 mL, 100 mL dan 1 000 mL terkalibrasi
- 5) Pipet ukur 10 mL I dan 100 mL terkalibrasi
- 6) Gelas piala 150 mL dan 500 mL Pemanas listrik

3.26.8.4 Pereaksi

- 1) Air suling bebas logam - Air suling yang telah mengalami 2 kali penyulingan.
- 2) Asam Nitrat (HNO₃ p.a.) *supra pure*.
- 3) Asam Nitrat (HNO₃ 1+1).

Tambahkan 1 bagian HNO₃ ke dalam 1 bagian air bebas logam.

- 4) Asam Klorida (HCl.p.a).
- 5) Asam Klorida (HCl 1+1)
 Tambahkan 1 bagian HCl ke dalam 1 bagian air bebas logam.
- 6) Larutan induk logm Fe, Mn, Pb, Cd, Cu, Cr, Co, Ni, Zn, Se, Ba, B, As dan Al 1 000 mg/L.
- 7) Larutan baku 100 mg/L.
 Pipet 10 mL larutan induk logam (Fe, Mn, Pb, Cd, Cu, Cr, Co, Ni, Zn, Se, As, Ba, B, dan Al) 1 000 mg/L ke dalam labu ukur 100 mL tambahkan air suling bebas logam yang mengandung HNO₃ (1,5 mL HNO₃ /L), tepatkan sampai tanda batas.
- 8) Siapkan larutan standar, kedalam labu ukur 100 mL tambahkan 2 mL HNO₃ 1+1 dan 10 mL HCl 1+1 tepatkan sampai tanda batas dengan air bebas logam. Larutan standar dapat dicampur.
 - a. Campuran larutan standar I : Mangan, kadmium, timbal, selenium dan seng.
 - b. Campuran larutan standar II : Barium, tembaga, besi, dan kobal.
 - c. Campuran larutan standar III : Arsen
 - d. Campuran larutan standar IV : Alumunium, kromium, nikel.
 - e. Campuran larutan standar V : Boron.
- 9) Kisaran konsentrasi standar dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3 - Panjang Gelombang yang disarankan, Estimasi Level Deteksi, Panjang Gelombang Alternatif, Limit Konsentrasi terendah dan Limit Konsentrasi Tertinggi

| Unsur | Panjang Gelombang yang disarankan <i>nm</i> | Estimasi Level Deteksi <i>µg/L</i> | Panjang Gelombang Alternatif <i>nm</i> | Limit Konsentrasi Terendah <i>mg/L</i> | Limit Konsentrasi Tertinggi <i>mg/L</i> |
|-----------|--|---------------------------------------|---|---|--|
| Arsen | 193.70 | 50 | 189.04 | 10.0 | 100 |
| Barium | 455.40 | 2 | 493.41 | 1.0 | 50 |
| Boron | 249.77 | 5 | 249.68 | 1.0 | 50 |
| Kadmium | 226.50 | 4 | 214.44 | 2.0 | 50 |
| Kromium | 267.72 | 7 | 206.15 | 5.0 | 50 |
| Kobal | 228.62 | 7 | 230.79 | 2.0 | 50 |
| Tembaga | 324.75 | 6 | 219.96 | 1.0 | 50 |
| Besi | 259.94 | 7 | 238.20 | 10.0 | 100 |
| Timbal | 220.35 | 40 | 217.00 | 10.0 | 100 |
| Mangan | 257.61 | 2 | 294.92 | 2.0 | 50 |
| Nikel | 231.60 | 15 | 221.65 | 2.0 | 50 |
| Selenium | 196.03 | 75 | 203.99 | 5.0 | 100 |
| Seng | 213.86 | 2 | 206.20 | 5.0 | 100 |
| Alumunium | 308.22 | 40 | 237.32 | 10.0 | 100 |

3.26.8.5 Cara Kerja

3.26.8.5.1 Untuk Contoh yang memerlukan destruksi asam

3.26.8.5.1.1 Untuk contoh yang mengandung matriks yang kompleks

Pipet 100 mL contoh dengan pengawetan HNO_3 yang telah dihomogenkan kedalam gelas piala 150 mL, tambahkan 3 mL HNO_3 p.a. dan batu didih, tutup dengan kaca arloji, panaskan diatas pemanas listrik sampai volumenya < 5 mL (pastikan contoh tidak sampai mendidih) dan pada bagian dasar gelas piala tidak ada bagian yang kering, dinginkan, Tambahkan lagi 5 mL HNO_3 p.a., tutup dengan kaca arloji dan panaskan kembali diatas pemanas listrik dan naikan suhunya, lanjutkan penambahan asam sampai destruksi sempurna atau larutan menjadi jernih atau penampakan tidak berubah pada penambahan asam dan pemanasan berikutnya. Dinginkan, tambah 10 mL HCl 1+1 dan 15 mL air bebas logam, panaskan kembali selama 15 menit untuk melarutkan endapan atau residu. Dinginkan, bilas dinding gelas piala dan kaca arloji dengan air bebas logam, saring dan pindahkan kedalam labu ukur 100 mL. Alternatif lain dengan *centrifuge* atau dibiarkan semalam, kemudian tepatkan sampai tanda tera.

3.26.8.5.1.2 Untuk contoh yang matriknya tidak kompleks.

Pipet 100 mL contoh dengan pengawetan HNO_3 yang telah dihomogenkan kedalam gelas piala, tambahkan 2 mL HNO_3 1+1 dan 10 mL HCl 1+1, tutup dengan kaca arloji, panaskan diatas pemanas listrik sampai volumenya 25 mL (pastikan contoh tidak sampai mendidih). Dinginkan, saring untuk menghilangkan zat yang tidak larut atau alternatif lain di *centrifuge*, atau dibiarkan semalam. Pindahkan contoh kedalam labu ukur 100 mL dan tepatkan sampai tanda tera.

3.26.8.5.2 Periksa contoh dengan menggunakan ICP.

3.26.8.6 Perhitungan

Hitung kandungan logam dalam contoh dengan menggunakan kurva kalibrasi atau persamaan garis regresi linier. Konsentrasi logam dihitung sebagai berikut :

$$(\text{mg/L}) = C \times F_p$$

Keterangan :

C = Adalah konsentrasi yang didapat hasil pengukuran (mg/L).

Fp = Faktor pengenceran.

3.26.8.7 Presisi dan data bias

Presisi dan data bias dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4 - Presisi dan Data Bias ICP

| Unsur | Range Konsentrasi µg/L | Dekstruksi Total µg/L | Dekstruksi Parsial µg/L |
|----------------|---------------------------|---|---|
| Alumunium (Al) | 60-4792 | $X = 0.9273C + 3.6$ $S = 0.0559X + 18.6$ $SR = 0.0507X + 3.5$ | $X = 0.9380C + 22.1$ $S = 0.0873X + 31.7$ $SR = 0.0481X + 18.8$ |
| Arsen (As) | 69-1887 | $X = 1.0437C - 12.2$ $S = 0.1239X + 2.4$ $SR = 0.0874X + 6.4$ | $X = 1.0175C + 3.9$ $S = 0.1288X + 6.1$ $SR = 0.0643X + 10.3$ |
| Barium (Ba) | 9-377 | $X = 0.7683C + 0.47$ $S = 0.1819X + 2.78$ $SR = 0.1285X + 2.55$ | $X = 0.8380C + 1.68$ $S = 0.2540X + 0.30$ $SR = 0.0826X + 3.54$ |
| Boron (B) | 19-5189 | $X = 0.8807C + 9.0$ $S = 0.1150X + 14.1$ $SR = 0.0742X + 23.2$ | $X = 0.9676C + 18.7$ $S = 0.1320X + 16.0$ $SR = 0.0743X + 21.1$ |
| Kadmium (Cd) | 9-1943 | $X = 0.9874C - 0.18$ $S = 0.0557X + 2.02$ $SR = 0.0300X + 0.94$ | $X = 1.0137C - 0.65$ $S = 0.0585X + 1.15$ $SR = 0.0332X + 0.90$ |
| Kromium (Cr) | 13-1406 | $X = 0.9544C + 3.1$ $S = 0.0499X + 4.4$ $SR = 0.0009X + 7.9$ | $X = 1.0049C - 1.2$ $S = 0.0698X + 2.8$ $SR = 0.0571X + 1.0$ |
| Kobal (Co) | 17-2340 | $X = 0.9209C - 4.5$ $S = 0.0436X + 3.8$ $SR = 0.0428X + 0.5$ | $X = 0.9278C - 1.5$ $S = 0.0498X + 2.6$ $SR = 0.0407X + 0.4$ |
| Tembaga (Cu) | 8-1887 | $X = 0.9297C - 0.3$ $S = 0.0442X + 2.85$ $SR = 0.0128X + 2.53$ | $X = 0.9647C - 3.64$ $S = 0.0497X + 2.28$ $SR = 0.0406X + 0.96$ |
| Besi (Fe) | 13-9359 | $X = 0.8829C + 7.0$ $S = 0.0683X + 11.5$ $SR = -0.0046X + 10.0$ | $X = 0.9830C + 5.7$ $S = 0.1024X + 13.0$ $SR = 0.0790X + 11.5$ |
| Timbal (Pb) | 42-4717 | $X = 0.9699C - 2.2$ $S = 0.0558X + 7.0$ $SR = 0.0353X + 3.6$ | $X = 1.0056C + 4.1$ $S = 0.0799X + 4.6$ $SR = 0.0448X + 3.5$ |

Tabel 4 - (lanjutan)

| Unsur | Range Konsentrasi $\mu\text{g/L}$ | Dekstruksi Total $\mu\text{g/L}$ | Dekstruksi Parsial $\mu\text{g/L}$ |
|---------------|--------------------------------------|--|---|
| Mangan (Mn) | 4-1887 | $X = 0.9417C + 0.13$ $S = 0.0324X + 0.88$ $SR = 0.0153X + 0.91$ | $X = 0.9725C + 0.07$ $S = 0.0557X + 0.76$ $SR = 0.0400X + 0.82$ |
| Nikel (Ni) | 17-47 170 | $X = 0.9508C + 0.4$ $S = 0.0604X + 4.4$ $SR = 0.0425X + 3.6$ | $X = 0.9869C + 1.5$ $S = 0.0526X + 5.5$ $SR = 0.0393X + 2.2$ |
| Selenium (Se) | 69-1415 | $X = 0.9363C - 2.5$ $S = 0.0855X + 17.8$ $SR = 0.0284X + 9.3$ | $X = 0.9737C - 1.0$ $S = 0.1523X + 7.8$ $SR = 0.0443X + 6.6$ |
| Seng (Zn) | 7-7076 | $X = 0.9356C - 0.30$ $S = 0.0914X + 3.75$ $SR = -0.0130X + 10.7$ | $X = 0.9500C + 1.22$ $S = 0.0597X + 6.50$ $SR = 0.0153X + 7.78$ |

X = Recovery rata-rata
 C = Nilai benar (Konsentrasi Contoh $\mu\text{g/L}$)
 S = Standar Deviasi multi-laboratorium $\mu\text{g/L}$
 SR = Standar Deviasi untuk satu analisis $\mu\text{g/L}$

3.27 Cemaran kimia organik

3.27.1 Aldrin dan dieldrin; Heptaklorepoksida; Metoksiklor

Ket : pada SNI produk AMDK ditulis Heptachlorepoxyde; Methoxychlor

3.27.1.1 Prinsip

1 liter contoh uji diekstraksi dengan CH_2Cl_2 dalam corong pemisah atau pengocok botol mekanik. Ekstrak CH_2Cl_2 dipisahkan, dikeringkan dengan Na_2SO_4 anhidrat, pelarut diganti (ditukar) dengan *methyl tert-butyl ether (MTBE)*, dan dipekatkan sampai 5 mL. Pestisida dipisahkan dan diukur dengan kolom kapiler kromatografi gas dengan detektor penangkap-elektron (*Electron Capture Detector /ECD*). Perkiraan kisaran limit deteksi metode 0,001 5 $\mu\text{g/L}$ untuk α - dan γ -*chlordane* sampai 5 $\mu\text{g/L}$ untuk *chlorbenzilate*; nilai-nilai untuk 24 senyawa yang lain berkisar antara 0,025 $\mu\text{g/L}$ dan 0,5 $\mu\text{g/L}$.

3.27.1.2 Peralatan

- Corong pemisah 2 000 mL, dengan kran *TFE-fluorocarbon*, dan penghubung gelas atau tutup *TFE-fluorocarbon*; ataubotol pengocok (*tumbler bottle*) 1,7 L, dengan tutup ulir bergaris. Rendam semalam dengan metanol sebelum digunakan;

b) peralatan *Kuderna-Danish* (K-D)



Sumber gambar : www.exeterscientific.com

c) (lihat gambar: *snyder column*)

- (1) Tabung konsentrator 10 mL atau 25 mL terkalibrasi (contoh : Kontes 570050-1025 atau 570050-2525, atau yang setara). Periksa kalibrasi dari tabung konsentrator yang digunakan dengan pipet volume. Gunakan tutup penghubung gelas untuk mencegah penguapan ekstrak;
- (2) labu evaporator 500 mL. Tempelkan tabung konsentrator dengan pegas;
- (3) *snyder columns, three-ball macro; 2-ball micro* (contoh : Kontes 569001-0219 atau yang setara)

d) *vial*, kapasitas 5 mL sampai 10 mL dengan tutup ulir *TFE-fluorocarbon*;

e) *separatory funnel shaker* (*shaker* corong pemisah), yang mampu menahan corong pemisah 2 L dan menggoyangkannya dengan gerakan mengayun secara menyeluruh mencampur isi corong; atau pengocok (*tumbler*), yang mampu menahan botol pengocok (*tumbler bottle*) (b), 30 putaran / menit;

f) batu didih *carborundum* (*silicon carbide*) no. 12. Panaskan pada suhu 400 °C selama 30 menit. Dinginkan dan simpan dalam desikator;

g) penangas air dengan kontrol pemanas ± 2 °C;

h) neraca analitik dengan pembacaan 0,1 mg;

i) kromatograf gas, dengan sistem suhu yang dapat diprogram, cocok digunakan dengan kolom kapiler, termasuk *syringe*, kolom analitik, gas, detektor, dan *recorder*. Sistem data dianjurkan untuk mengukur luas puncak. Kolom kromatografi gas terdiri dari:

- 1) kolom primer: kolom kapiler 30 m \times 0,25 mm id DB-5 *fused-silica*, ketebalan lapisan (*film*) 0,25 μ m.
- 2) kolom penegasan (*confirmation column*) :kolom kapiler 30 m \times 0,25 mm id DB-1701 *fused-silica*, ketebalan lapisan (*film*) 0,25 μ m. (Jika diperlukan)
Kondisi operasional: volume penyuntikan 2 μ L secara *splitless* dengan penundaan 45 detik; dan kecepatan linier gas pembawa He pada 30 cm /detik;
Temperatur injector 250 °C; detektor 320 °C; oven diprogram dari 60 °C sampai 300 °C pada 4 °C / menit;
- 3) detektor : ECD

3.27.1.3 Pereaksi

a) Larutan standar – gunakan standar senyawa uji dengan kemurnian ≥ 96 % untuk menyiapkan larutan stok 1 mg/mL dalam *methyl tert-butyl ether* (MTBE). Larutan stok standar yang disiapkan secara komersial dapat digunakan pada konsentrasi apapun jika

disertifikasi oleh produsen atau sumber independen. Simpan larutan pada suhu ruang dan lindungi dari cahaya. Ganti larutan stok standar setelah 2 bulan, atau lebih cepat jika dibandingkan dengan kontrol standar laboratorium sudah menunjukkan adanya penurunan/degradasi;

- b) larutan standar internal: Buat larutan stok 0,1 mg/mL *pentachloronitrobenzene* (kemurnian 98 %) dalam *MTBE*. Tambahkan 5 µL larutan stok ke dalam 5 mL ekstrak contoh uji untuk memberikan konsentrasi standar internal akhir 0,1 µg *pentachloronitrobenzene*/mL ekstrak;
- c) larutan pengganti – Buat larutan stok 0,5 mg/mL 4,4' – *dichlorobiphenyl* (kemurnian ≥ 96 %) dalam *MTBE*. Tambahkan 50 µL larutan stok ke dalam 1 L contoh uji sebelum ekstraksi untuk menghasilkan konsentrasi pengganti untuk 25 µg 4,4' – *dichlorobiphenyl*/L dalam contoh uji dan dengan dugaan perolehan kembali secara kuantitatif 5,0 µg/mL dalam ekstrak;
- d) larutan kinerja alat – Buat larutan stok standar individual 0,10 mg/mL yang mengandung *chlorothalonil*, *chlorpyrifos*, *DCPA*, dan δ -*BHC* dalam *MTBE*. Untuk penilaian kinerja alat, gabungkan 50 µL larutan stok *chlorothalonil*, 2 µL larutan stok *chlorpyrifos*, 50 µL larutan stok *DCPA* dan 40 µL larutan stok δ -*BHC* dalam labu ukur 100 mL dan encerkan sampai tanda tera dengan *MTBE*;
- e) pelarut – aseton, metilen klorida dan *MTBE*. Suling di dalam kaca berkualitas, atau yang setara;
- f) buffer fosfat – pH 7. Campur 29,6 mL HCl 0,1 M dan 50 mL dikalium hidrogen fosfat 0,1 M;
- g) natrium sulfat – granul/ butiran, anhidrat. Panaskan dalam cawan penguap selama ≥ 4 jam pada suhu 450 °C untuk menghilangkan zat organik yang mengganggu;
- h) natrium klorida – Kristal/hablur. Mutu ACS atau yang setara. Panaskan dalam cawan penguap selama ≥ 4 jam pada suhu 450 °C untuk menghilangkan zat organik yang mengganggu;
- i) air untuk pereaksi – air bebas cemaran yang menghalangi penentuan analit yang dituju;
- j) pengawet – Larutan merkuri klorida. 10 mg HgCl₂ Mutu ACS atau yang setara dalam 1 mL air untuk pereaksi (i), khusus untuk sampel yang perlu diawetkan

CATATAN Hati-hati ! Bahan ini berbahaya dan berakibat pada pencemaran lingkungan.

- k) natrium tiosulfat – Na₂S₂O₃. granul/ butiran, anhidrat. Mutu ACS atau yang setara.

3.27.1.4 Persiapan botol contoh laboratorium

Tambahkan 1 mL pengawet, 3.27.1.3.j, ke botol contoh laboratorium. Jika residu klorin diduga akan ada dalam contoh laboratorium, tambahkan 80 mg Na₂S₂O₃ 3.27.1.3.k sebelum pengambilan contoh.

3.27.1.5 Pengambilan contoh laboratorium

Ambil 1 L contoh laboratorium dalam botol kaca dengan cara pengambilan contoh biasa. Karena botol berisi pengawet dan Na₂S₂O₃ jangan bilas botol sebelumnya dengan contoh. Tambahkan contoh ke dalam botol yang berisi pengawet, Tutup/segel botol contoh dan kocok kuat 1 menit. Dinginkan contoh pada 4 °C dari waktu pengumpulan sampai diekstraksi. Lindungi dari cahaya. Ekstraksi contoh laboratorium tidak lebih dari 7 hari dari waktu pengambilan contoh.

3.27.1.6 Persiapan contoh laboratorium

- a) Metode ekstraksi secara otomatis
 - 1) Tandai meniskus air di sisi botol contoh laboratorium untuk menentukan volume akhir. Tambah 50 µL larutan stok pengganti, 3.27.1.3.c ke contoh uji. Apabila digunakan corong pemisah, tuang seluruh contoh ke dalam corong pemisah 2 L. Apabila digunakan tumbler mekanik, tuang seluruh contoh ke dalam *tumbler bottle*.

Atur pH contoh uji menjadi 7 dengan menambahkan 50 mL buffer fosfat, 3.27.1.3.f. Cek pH, jika perlu tambahkan H_2SO_4 atau NaOH .

- 2) Tambahkan 100 g NaCl , segel/tutup dan kocok untuk melarutkan garam. Tambah 300 mL CH_2Cl_2 ke corong pemisah atau botol *tumbler*, tutup dan kocok 30 detik untuk membilas dinding bagian dalam. Buka keran ventilasi secara berkala setiap pengocokan 10 detik. Ulangi pengocokan sambil sesekali dibuka dan ditutup kerannya sampai dengan tidak ada tekanan. Tutup kembali corong pemisah dan letakkan pada penyangga alat mekanik yang sesuai (*shaker* atau *tumbler*) dan kocok selama 1 jam

Sesudah ekstraksi, tuang isi *tumbler bottle* ke dalam corong pemisah 2 L (khusus untuk yang menggunakan *tumbler bottle*). Biarkan lapisan organik terpisah dari Fase air selama ≥ 10 menit. Apabila emulsi antara lapisan lebih dari sepertiga volume lapisan pelarut, sempurnakan pemisahan dengan cara mekanik. Kumpulkan ekstrak CH_2Cl_2 dalam labu *Erlenmeyer* 500 mL yang mengandung 5 g Na_2SO_4 anhidrat. Goyangkan labu untuk mendapat ekstrak kering; diamkan labu 15 menit. Tentukan volume contoh laboratorium awal dengan mengisi ulang botol contoh laboratorium untuk menandai dan pindahkan air dengan gelas ukur 1 000 mL. Catat volume pada 5 mL terdekat.

b) Metode ekstraksi secara manual

- 1) Tandai meniskus air di sisi botol contoh laboratorium untuk menentukan volume akhir. Tambah 50 μL larutan stok pengganti, 3.27.1.3.c, ke contoh uji laboratorium, tuang seluruh contoh laboratorium ke dalam corong pemisah 2 L. Atur pH contoh uji menjadi 7 dengan menambahkan 50 mL buffer fosfat, 3.27.1.3.f. Cek pH, jika perlu tambahkan H_2SO_4 atau NaOH . Tambahkan 100 g NaCl ke dalam wadah, segel/tutup dan kocok untuk melarutkan garam. Tambah 60 mL CH_2Cl_2 ke dalam botol pengocok, segel/tutup dan kocok 30 detik untuk membilas dinding bagian dalam.
- 2) Pindahkan bilasan ke dalam corong pemisah dan ekstrak contoh laboratorium dengan mengocok corong dengan keras selama 2 menit dengan secara berkala membuka kran ventilasi untuk melepaskan tekanan berlebih. Biarkan lapisan organik terpisah dari fase air selama ≥ 10 menit. Apabila emulsi pertemuan antara lapisan lebih dari sepertiga volume lapisan pelarut, sempurnakan pemisahan secara mekanik. Kumpulkan ekstrak CH_2Cl_2 dalam labu *Erlenmeyer* 500 mL yang mengandung 5 g Na_2SO_4 anhidrat. Tambahkan 60 mL CH_2Cl_2 kedua ke dalam corong pemisah dan ulangi prosedur ekstraksi untuk kedua kalinya, satukan ekstrak dalam labu *Erlenmeyer*. Lakukan ekstraksi ketiga dengan cara yang sama. Aduk labu untuk mendapat ekstrak kering air; diamkan labu 15 menit. Tentukan volume contoh laboratorium awal dengan mengisi ulang botol contoh laboratorium untuk menandai dan pindahkan air dengan gelas ukur 1 000 mL. Catat volume pada 5 mL terdekat.

3.27.1.7 Pemekatan ekstrak

- a) Pasang alat pemekat (konsentrator) dengan memasang tabung konsentrator 25 mL ke labu penguapan 500 mL. Tuang ekstrak CH_2Cl_2 ke dalam konsentrator. Bilas Na_2SO_4 yang tersisa dengan dengan dua bagian 25 mL CH_2Cl_2 dan tuang bilasan ke dalam konsentrator;
- b) tambah 1 atau 2 batu didih bersih ke dalam labu penguapan dan pasang kolom *Snyder-makro*. Sebelumnya basahi kolom dengan menambahkan 1 mL CH_2Cl_2 ke atas. Letakan alat *K-D* dalam penangas air 65 °C sampai 75 °C sehingga tabung konsentrator sebagian terendam dalam air panas dan seluruh permukaan bulat labu dibasahi dengan uap panas. Atur posisi alat uji vertikal dan suhu air yang diperlukan untuk menyelesaikan pemekatan dalam waktu 15 menit sampai 20 menit. Pada laju yang tepat dari destilasi, bola dalam kolom akan secara aktif gemeletak, tapi wadah *chamber* tidak akan meluap. Ketika

- volume cairan t mencapai 2 mL, lepaskan peralatan *K-D* dan biarkan mengalir dan dinginkan selama ≥ 10 menit;
- c) lepaskan kolom *Snyder* dan bilas labu dan gabungkan dengan 1 mL sampai 2 mL *MTBE*, kumpulkan hasil bilasan dalam tabung pemekat. Tambah 5 mL sampai 10 mL *MTBE* dan batu didih yang baru. Pasang kolom *Snyder*-mikro pada tabung pemekat dan kolom sebelumnya dibasahi dengan menambahkan $\pm 0,5$ mL *MTBE* pada bagian atas. Letakkan peralatan *K-D* mikro dalam penangas air sehingga tabung konsentrator sebagian terendam dalam air panas. Atur posisi alat vertikal dan suhu air yang diperlukan untuk menyelesaikan pemekatan dalam waktu 15 menit sampai 10 menit. Ketika volume cairan terlihat mencapai 2 mL, keluarkan peralatan dari penangas dan biarkan mengalir dan dingin. Tambah 5 mL sampai 10 mL *MTBE* dan batu didih dan pekatkan sampai 2 mL. Keluarkan peralatan *K-D* mikro dari penangas dan biarkan mengalir dan dingin. Lepas kolom *Snyder*-mikro dan bilas dinding tabung pemekat sambil menyesuaikan volume menjadi 5,0 mL dengan *MTBE*.
- d) Tambah 5 μ L larutan stok standar internal, 3.27.1.3.b ke ekstrak uji, tutup, dan kocok untuk menghomogenkan standar internal. Pindahkan ekstrak ke dalam botol bertutup ulir *TFE-fluorocarbon* dengan ukuran yang sesuai, tutup rapat dan simpan pada 4 °C sampai dianalisis tidak lebih dari 14 hari.

3.27.1.8 Kalibrasi kromatograf gas dengan detektor penangkap-elektron

Tabel 5 merangkum kondisi pengoperasian yang direkomendasikan untuk kromatografi gas dan waktu retensi yang diamati dengan menggunakan metode ini. Contoh dari pemisahan menggunakan kondisi ini ditunjukkan dalam Gambar 5 dan Gambar 6. Pada awalnya lakukan kalibrasi 5-tingkat konsentrasi larutan standar stok dalam kisaran linier detector, dengan menggunakan standar internal dan relatif faktor respons. Apabila nilai *response factor* (FR) pada rentang kerja konstan/tetap (≤ 10 % RSD), rata-rata FR dapat digunakan untuk perhitungan. Periksa kurva kalibrasi setiap hari dengan menggunakan 1 atau 2 standar kalibrasi. Jika respon kuantitas analit bervariasi > 20 % dari rata-rata faktor respon relative untuk kalibrasi awal, analisis terhadap standar satu tingkat harus diulang dengan standar baru. Sebagai alternatif, kurva kalibrasi baru harus disiapkan.

Tabel 5 - Kondisi kromatografi gas, abstrak nomor layanan pendaftaran kimia, kodeidentifikasi puncak, relatif waktu retensi dan perkiraan limit deteksi metode untuk 4 pestisida organoklorin

| Analit | No CAS | No puncak ^a | retensi relatif ^b | | Perkiraan limit deteksi metode |
|--------------------------|-----------|------------------------|------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| | | | Primer/utama ^c | Penegasan ^d | |
| <i>Aldrin</i> | 309-00-2 | A7 | 1,18 | 1,12 | 0,075 0 |
| <i>Dieldrin</i> | 60-57-1 | A11 | 1,35 | 1,35 | 0,020 0 |
| <i>Heptaklorepoksida</i> | 1024-57-3 | A9 | 1,24 | 1,24 | 0,015 0 |
| <i>Metoksiklor</i> | 73-43-5 | B14 | 1,57 | 1,58 | 0,050 0 |

Keterangan:

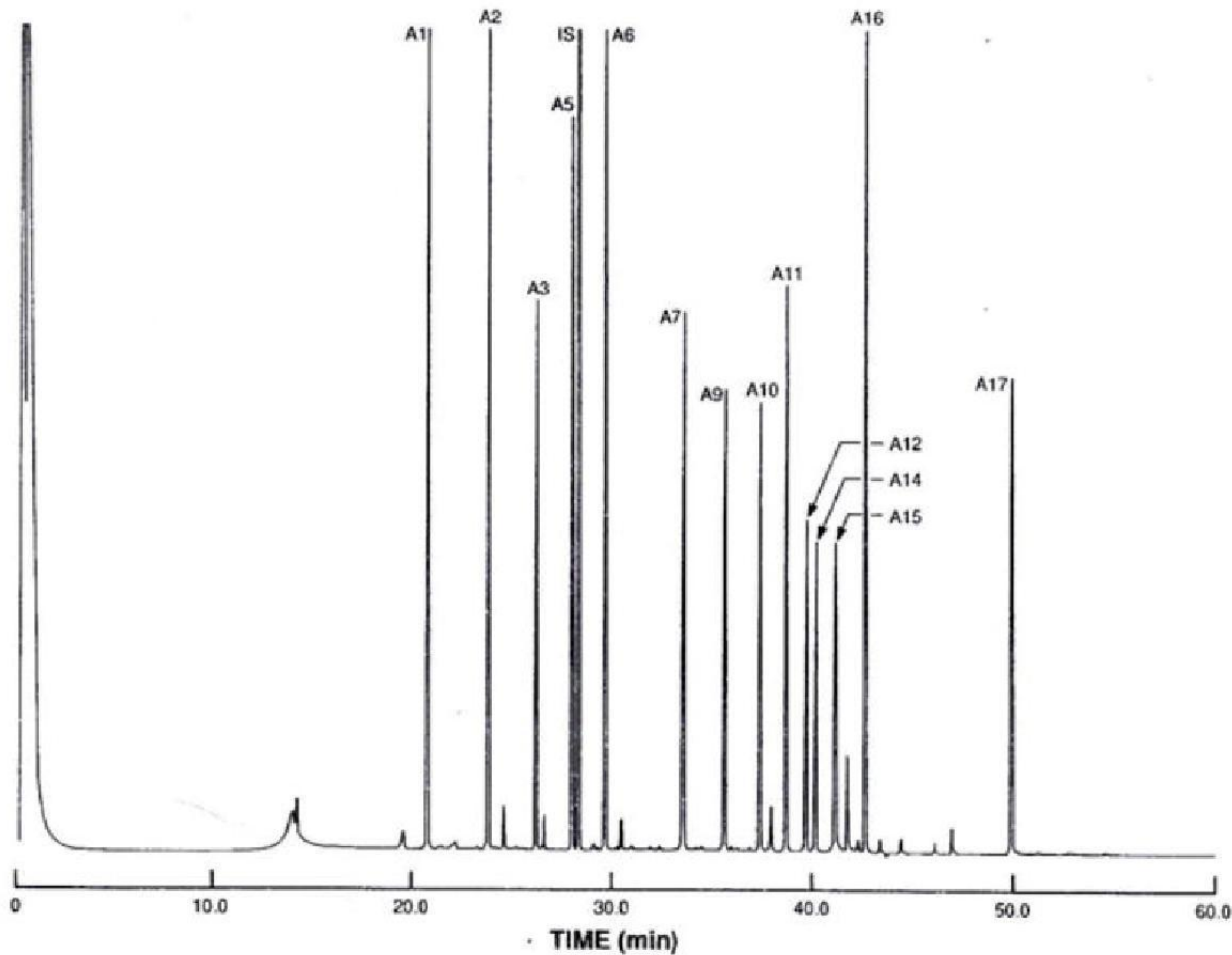
^a identifikasi puncak kromatografi ditunjukkan dalam gambar A dan B. Huruf yang menunjukkan campuran penambahan *spike* (A atau B) mengandung analit tersebut.

^b Relatif waktu retensi dibandingkan dengan standar internal

c,d lihat 3.27.1.2.j untuk keterangan kolom dan kondisi operasi

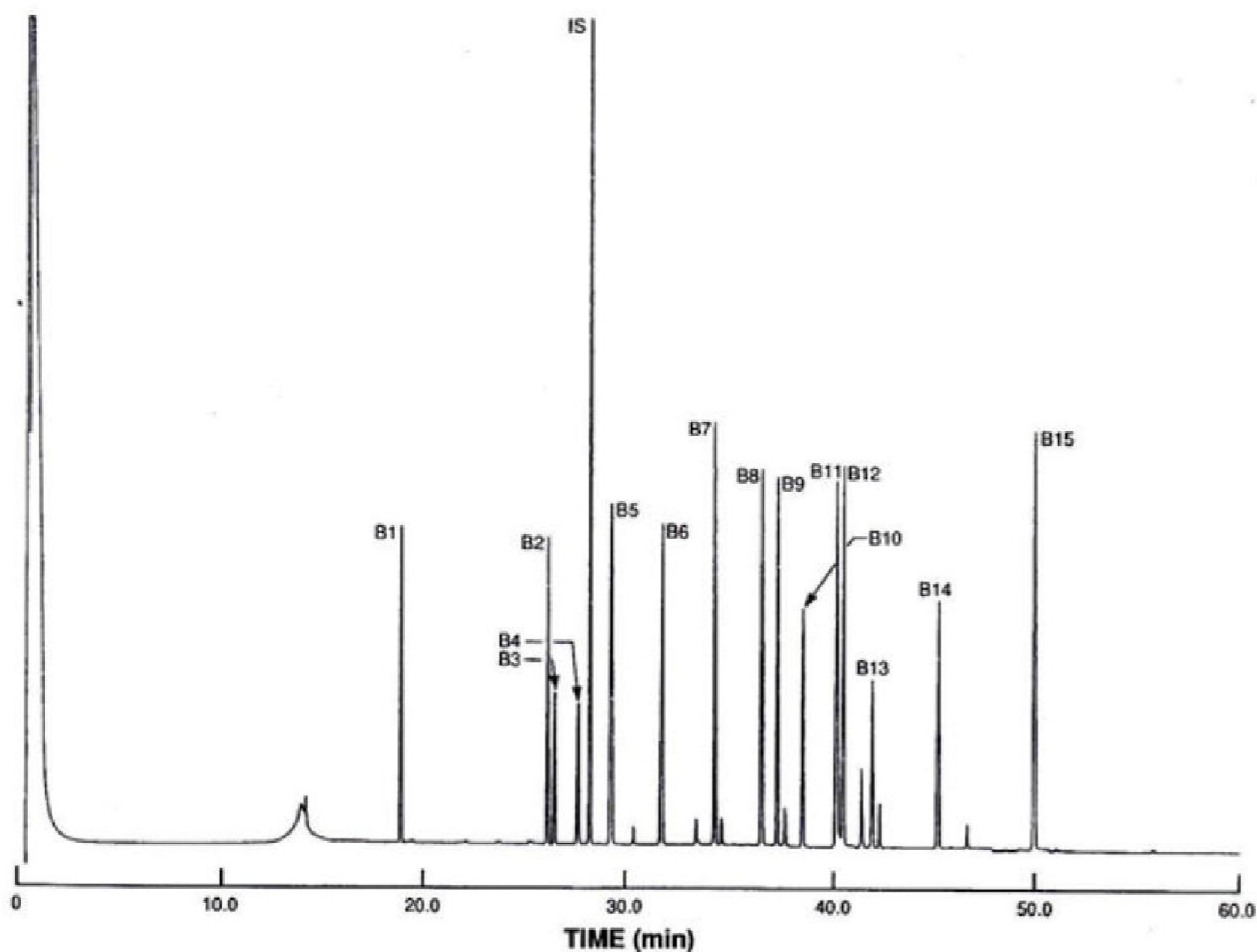
Tabel 6 – Hasil kajian antar laboratorium untuk 4 pestisida organoklorin dalam air

| Pestisida | Air suling | | | | Air minum | | | |
|--------------------|----------------|----------------|----------------------|----------------------|----------------|----------------|----------------------|----------------------|
| | S _r | S _R | RSD _r , % | RSD _R , % | S _r | S _R | RSD _r , % | RSD _R , % |
| Aldrin | 6,2 | 13,2 | 6,7 | 14,3 | 4,9 | 15,3 | 5,8 | 18,2 |
| Dieldrin | 8,7 | 15,3 | 9,0 | 15,8 | 5,8 | 12,4 | 6,5 | 14,0 |
| Heptachlor epoxide | 4,9 | 12,2 | 5,1 | 12,7 | 6,5 | 6,54 | 6,8 | 8,7 |
| Metocychlor | 11,2 | 19,8 | 10,6 | 18,8 | 13,2 | 26,5 | 14,0 | 28,2 |



Keterangan:
Lihat 3.27.1.2.j untuk kondisi operasi dan Tabel 6 untuk mengidentifikasi puncak.
IS = standar internal.

Gambar 5 - Kromatogram GC / ECD senyawa grup A yang dianalisis dengan kolom kapiler 30 m ×0,25 mm id DB-5 fused silica (film 0,25 µm).

**Keterangan:**

Lihat A.3.1.2.j untuk kondisi operasi dan Tabel 6 untuk mengidentifikasi puncak.

IS = standar internal

Gambar 6 - Kromatogram GC / ECD senyawa grup B yang dianalisis dengan kolom kapiler 30 m × 0,25 mm id DB-5 fused-silica(film 0,25 µm).

3.27.1.9 Pengawasan mutu

Persyaratan pengawasan mutu minimum untuk metode ini meliputi

- Demonstrasi awal kinerja metode;
- analisis standar pengganti dalam setiap bagian uji (perolehan kembali yang dapat diterima adalah 70 % sampai 130 %);
- pemantauan terhadap jumlah luas standar internal dalam setiap ekstrak (luas standar internal harus berada dalam jarak 30 % dari luas dalam standar kalibrasi);
- analisis blangko sebagai tindak lanjut untuk memeriksa pencemaran bagian uji;
- analisis penambahan *spike* pada bagian uji sebagai tindak lanjut untuk memeriksa perolehan kembali;
- analisis standar pengawasan mutu alat untuk memastikan kinerja alat dapat diterima, lihat Tabel 7.

Tabel 7 - Standar pengawasan mutu alat

| Uji | Analit | Konsentrasi, µ/L | Persyaratan |
|-----------------------|---------------------------------------|------------------|--|
| Sensitivitas | <i>Chlorpyrifos</i> | 0,002 | deteksi analit; S/N >3 |
| Kinerja kromatografik | DCPA | 0,05 | PSF diantara 0,80 dan 1,15 PGF diantara 0,80 dan 1,15 |
| Kinerja kolom | <i>Chlorothalonil</i> <i>δ-BHC</i> | 0,05 0,04 | R > 0,50 |

3.27.1.10 Perhitungan

a) RF

$$RF = \frac{(As)(Cis)}{(Ais)(Cs)}$$

Keterangan:

As = respon untuk senyawa yang diukur

Ais = respon untuk standar internal

Cis = konsentrasi untuk standar internal

Cs = konsentrasi untuk senyawa yang diukur

Hitung % RSD untuk rata-rata RFs untuk masing-masing senyawa. Rata-rata RF dapat digunakan jika RSD kurang dari 20 %

b) Konsentrasi

$$\text{Konsentrasi, } \mu\text{g/L} = \frac{A_s \times C_{is}}{A_{is} \times RF}$$

Keterangan :

A_s = Area/respon dari senyawa yang diukur

A_{is} = Area/respon dari internal standar

RF = *Respons Factor*

c) Hitung *peak symmetry factor* (PSF), *peak Gaussian factor* (PGF) dan resolusi diantara 2 puncak (R) sebagai berikut:

$$PSF = \frac{w(1/2)}{0,5 \times W(1/2)}$$

Keterangan:

$w(1/2)$ = lebar puncak depan pada ketinggian setengah, puncak dianggap terbagi pada titik tertinggi; dan

$W(1/2)$ = lebar puncak pada ketinggian setengah.

$$PGF = \frac{1,83 \times W(1/2)}{W(1/10)}$$

Keterangan:

$W(1/2)$ = lebar puncak pada ketinggian setengah dan $W(1/10)$ lebar puncak pada ketinggian ke10.

$$R = \frac{t}{W}$$

Keterangan:

t = perbedaan waktu elusi diantara 2 puncak dan

W = rata-rata lebar puncak dari 2 puncak di garis dasar.

- d) Tunjukkan kinerja metode awal dengan mengekstraksi empat kali 1 L bagian uji air untuk pereaksi 3.27.1.3.i. Tambahkan *spike* (larutan standar stok) pada konsentrasi ± 10 kali dari limit deteksi metode yang diperkirakan. Hitung rata-rata persen perolehan kembali (% *recovery*) dan simpangan baku (*standard deviation*) dari persen perolehan kembali (% *recovery*). Untuk kinerja yang dapat diterima, simpangan baku relatif (*relative standard deviation*) seharusnya $< 20\%$ dan rata-rata perolehan kembali analit harus berada dalam 70% sampai 130% .

3.27.2 Detergen (Spektrofotometer secara biru metilen)**3.27.2.1 Prinsip**

Surfaktan anionik bereaksi dengan biru metilen membentuk pasangan ion berwarna biru yang larut dalam pelarut organik. Intensitas warna biru yang terbentuk diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 652 nm. Serapan yang terukur setara dengan kadar surfaktan anionik.

3.27.2.2 Peralatan

- Spektrofotometer;
- Timbangan analitik;
- Corong pemisah 500 mL, 250 mL; sebaiknya menggunakan keran (*stopcock* dan *stopper*) yang terbuat dari Teflon
- Labu ukur 100 mL; 500 mL; 1 000 mL;
- Gelas piala 200 mL;
- Pipet volumetrik 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL; 5,0 mL; dan
- Pipet ukur 5 mL dan 10 mL.

3.27.2.3 Pereaksi

- Larutan stok linier alkilbenzen sulfonat (LAS): larutkan 1,00 g LAS 100 % aktif atau natrium lauril sulfat ($C_{12}H_{25}OSO_3Na$) dengan air suling dalam labu ukur 1 000 mL dan tepatkan sampai tanda tera (1,00 mL larutan stok = 1,00 mg LAS)
CATATAN simpan larutan stok dalam lemari es untuk mengurangi biodegradasi. Jika diperlukan buat larutan setiap minggu. Bila terbentuk endapan, larutan ini tidak dapat dipergunakan.
- Larutan standar LAS: encerkan 10,00 mL larutan stok LAS dengan air suling dalam labu 1 000 mL dan tepatkan sampai tanda tera (1,00 mL larutan standar = 10 μ g LAS). Buat larutan standar setiap hari
- Larutan kerja LAS: pipet 1,0 mL; 2,0 mL; 3,0 mL dan 5,0 mL larutan LAS 100 mg/dan masukkan masing-masing ke dalam labu ukur 250 mL, tambahkan air suling sampai tepat pada tanda tera sehingga diperoleh kadar LAS 0,4; 0,8; 1,2 dan 2,0 mg/L.
- Larutan indikator fenolftalin 0,5%: larutkan 0,5 g fenolftalin dengan 50 mL alkohol 95 % di dalam gelas piala 250 mL. Tambahkan 50 mL air suling dan beberapa tetes larutan NaOH 0,02 N sampai warna merah muda.
- Larutan Natrium Hidroksida (NaOH) 1 N: larutkan 4,0 g NaOH dengan 50 mL air suling di dalam labu ukur 100 mL, tambahkan air suling sampai tepat tanda tera dan homogenkan.

- f) Asam sulfat (H_2SO_4) 6 N: ambil 20 mL H_2SO_4 pekat, kemudian masukkan ke dalam gelas piala 200 mL yang berisi 120 mL air suling dan homogenkan.
- g) Kloroform (CHCl_3). Peringatan: kloroform beracun dan diduga karsinogen. Lakukan tindakan pencegahan yang tepat jika terhirup dan terpapar kulit.
- h) Pereaksi biru metilen: larutkan 100 mg biru metilen dalam 100 mL air suling dan homogenkan. Ambil 30 mL larutan tersebut dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL, tambahkan 500 mL air suling, 41 mL H_2SO_4 6 N dan 50 g natrium fosfat monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), kocok hingga larut sempurna kemudian tambahkan air suling hingga tepat tanda tera dan homogenkan.
- i) Larutan pencuci: ambil 41 mL H_2SO_4 6 N dan masukkan ke dalam labu ukur 1 000 mL yang berisi 500 mL air suling. Tambahkan 50 g natrium fosfat monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) kocok hingga larut sempurna kemudian tambahkan air suling hingga tepat tanda tera dan homogenkan.
- j) isoprofil alkohol ($i\text{-C}_3\text{H}_7\text{OH}$)
- k) Hidrogen peroksida (H_2O_2) 30%
- l) Serabut kaca (*glass wool*): terlebih dahulu diekstrak dengan CHCl_3 untuk menghilangkan pengganggu.
- m) Air, bebas dari *methylene blue active substances* (MBAS), untuk digunakan dalam pembuatan pereaksi dan pengenceran.

3.27.2.4 Cara kerja

3.27.2.4.1 Pembuatan kurva kalibrasi

- a) Optimalkan alat spektrofotometer sesuai dengan petunjuk alat untuk pengujian kadar surfaktan anionik
- b) Persiapkan kurva kalibrasi awal yang terdiri dari sedikitnya lima standar sesuai dengan rentang konsentrasi yang diinginkan. Metode ini linier untuk standar MBAS pada perkiraan konsentrasi 10 μg sampai 200 μg . Hal ini dapat bervariasi, tergantung pada sumber bahan baku standar.
- c) Pastikan linieritas kurva kalibrasi, dengan nilai $r = 0,995$ atau yang lebih baik. Lakukan pemeriksaan standar setiap hari pada batas pelaporan dan pada konsentrasi yang diharapkan untuk konsentrasi contoh.
- d) Ambil masing-masing 100 mL larutan blanko dan larutan kerja dengan kadar LAS 0,4 mg/L; 0,8 mg/L; 1,2 mg/L dan 2,0 mg/L, kemudian masing-masing masukkan ke dalam corong pemisah 250 mL
- e) Larutan dikondisikan basa dengan penambahan 1 tetes penambahan NaOH 1 N, gunakan indikator fenolftalin. Hentikan saat warna merah muda muncul dengan penambahan 1 N H_2SO_4 setetes demi tetes
- f) Tambah 10 mL kloroform, CHCl_3 dan 25 mL pereaksi biru metilen. Kocok corong dengan keras selama 30 detik, sekali-kali buka tutup corong untuk mengeluarkan gas. Biarkan sampai terjadi pemisahan fase, goyangkan corong pemisah perlahan-lahan. Pengocokan yang berlebihan dapat menyebabkan pembentukan emulsi. Untuk memecah emulsi yang tetap (*persistent*) tambah sejumlah kecil volume isoprofil alkohol (< 10 mL); tambah juga isoprofil alkohol dengan volume yang sama ke seluruh standar. Beberapa contoh membutuhkan waktu pemisahan fase lebih lama daripada yang lainnya.
- g) Alirkan lapisan bawah (fase kloroform, CHCl_3) ke dalam corong pemisah kedua. Bilas tabung pertama dari labu pemisah dengan sedikit CHCl_3 .
- h) Ekstraksi kembali fase air dalam corong pemisah dengan mengulang langkah e dan f sebanyak dua kali. Pada setiap ekstraksi gunakan 10 mL CHCl_3 . Jika warna biru dalam fase air menjadi samar atau hilang, buang dan ulangi menggunakan contoh yang lebih kecil.
- i) Satukan semua fase kloroform dalam corong pemisah kedua. Tambah 50 mL larutan pencuci ke dalam fase kloroform gabungan dan kocok dengan kuat selama 30 detik. Pada tahap ini jangan terbentuk emulsi. Biarkan mengendap, aduk, dan alirkan lapisan

- CHCl₃ melalui corong yang berisi serat kaca *glass wool* ke dalam labu ukur 100 mL; filtrat harus jernih.
- j) Ekstrak larutan pencuci dua kali masing-masing dengan 10 mL CHCl₃ dan tambahkan ke labu melalui serat kaca. Bilas serat kaca dan corong dengan CHCl₃. Kumpulkan hasil pencucian dalam labu ukur dan encerkan sampai tanda tera dengan CHCl₃.
 - k) Ukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 652 nm dan catat absorbannya
 - l) Plot kurva kalibrasi antara absorbansi dan microgram LAS, tentukan berat molekul LAS yang digunakan

3.27.2.4.2 Jumlah contoh

Untuk analisis langsung terhadap air dan air limbah, pilih volume sampel berdasarkan konsentrasi MBAS yang diperkirakan

| Konsentrasi MBAS yang diperkirakan mg/L | Contoh yang diambil |
|--|---------------------|
| 0,025 – 0,080 | 400 |
| 0,08 – 0,40 | 250 |
| 0,4 – 2,0 | 100 |

Jika konsentrasi MBAS yang diperkirakan diatas 2 mg/L, encerkan contoh sehingga mengandung 40 µg sampai 200 µg MBAS dalam 100 mL dengan air.

3.27.2.4.3 Perlakuan dengan peroksida

jika diperlukan untuk mencegah penghilangan warna (*decolorization*) dari biru metilen oleh sulfida, tambahkan beberapa tetes H₂O₂ 30 %.

3.27.2.4.4 Pengujian contoh

- a) Ukur contoh uji sebanyak 100 mL secara duplo dan masukkan ke dalam corong pemisah;
- b) Larutan dikondisikan basa dengan penambahan 1 tetes penambahan NaOH 1 N, gunakan indikator fenolftalin. Hentikan saat warna merah muda muncul dengan penambahan 1 N H₂SO₄ setetes demi tetes
- c) Selanjutnya lakukan langkah 3.27.2.4.1.f sampai dengan 3.27.2.4.1.k

3.27.2.5 Perhitungan

Dari kurva kalibrasi baca mikrogram LAS yang jelas kelihatan (mol wt —) yang sesuai dengan absorbansi yang diukur

$$\text{mg MBAS/L} = \frac{\mu\text{g LAS yang jelas kelihatan}}{\text{mL contoh asli}}$$

laporkan sebagai MBAS dihitung sebagai LAS, mol wt —

3.27.3 1,2-dikloroetana

Ket : pada SNI produk AMDK ditulis 1,2-dikloroethan

3.27.3.1 *Purge and trap capillary-column gas chromatographic/mass spectrometric method*

3.27.3.1.1 Prinsip

Senyawa organik volatil secara efisien dirubah dari fase cair ke fase gas dengan mengalirkan gas inert mulia (misalnya helium), melalui contoh air yang terdapat dalam ruang pembilasan (*purging*) yang dirancang khusus pada suhu ruang. Uap dilewatkan melalui penjerap (*trap*) yang menyerap analit target. Setelah proses *purging* tersebut selesai, penjerap dipanaskan dan dibilas kembali dengan melewatkan gas inert yang sama untuk menyerap kembali senyawa ke kolom kromatografi gas. Kromatografi gas diprogram dengan suhu tertentu untuk memisahkan analit. Detektor yang digunakan adalah spektrometer massa.

3.27.3.1.2 Peralatan

a) *Purge and trap system*: terdiri atas alat pembilas (*purging device*), penjerap dan *desorber*. Beberapa sistem yang lengkap tersedia secara komersial.

- 1) Alat pembilas (*purging device*), dirancang untuk menampung 25 mL contoh menggunakan kolom air dengan kedalaman minimal 5 cm. Alat pembilas (*purging device*) yang lebih kecil dari 5 mL dapat digunakan jika batas deteksi metode terpenuhi dan kriteria kinerja juga terpenuhi. Jaga *headspace* gas diantara kolom air dan penjerap dengan volume total kurang dari 15 mL. Lewatkan gas pembilas melalui kolom air sebagai gelembung halus yang terpisah dengan diameter *tubing* kurang dari 3 mm di titik asal. Masukkan gas pembilas tidak lebih dari 5 mm dari dasar kolom air. Alat pembilas (*purging device*) dapat dilihat pada Gambar 7.

Jarum penyemprot (*needle spargers*) dapat digunakan sebagai pengganti *glass frit* seperti yang ditunjukkan pada Gambar 7. Masukkan gas pembilas pada titik < 5 mm dari dasar kolom air.

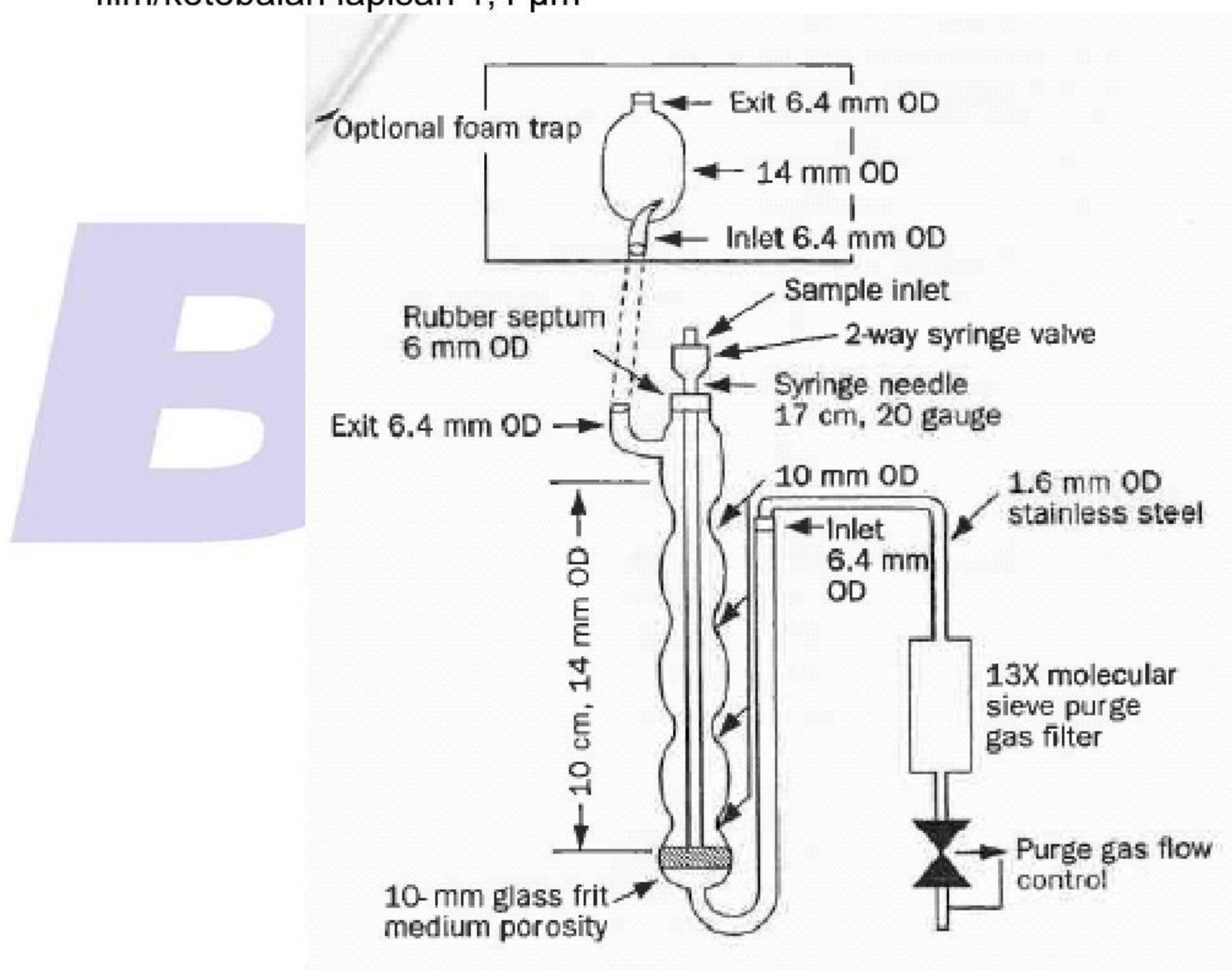
- 2) Penjerap, Panjang minimal 25 cm dan diameter dalam minimal 3 mm, dikemas dengan beberapa bahan penyerap (*adsorbents*) yang masing-masing memiliki panjang minimum 1,0 cm penyerap yang dilapisi *methyl silicone*; 7,7 cm polimer 2,6-*diphenylene oxide*; 7,7 cm *silica gel* dan 7,7 cm karbon aktif. Jika analisis tidak harus dilakukan untuk diklorodifluorometana (*dichlorodifluoromethane*) karbon aktif dapat dihilangkan dan bagian polimer diperpanjang sampai 15 cm. Penyerap alternatif dapat digunakan asalkan semua kriteria pengawasan mutu terpenuhi. Berbagai penjerap tersedia secara komersial; pastikan bahwa penjerap menyimpan volume total gas per satuan waktu pemurnian yang tetap (misalnya 40 mL / menit selama 11 menit) dan kinerjanya memenuhi semua kriteria pengawasan mutu. Spesifikasi minimum untuk penjerap digambarkan pada Gambar 8.

Penyerap yang dilapisi *Methyl silicone* disarankan, tetapi tidak diwajibkan. Penyerap tersebut—melindungi penyerap polimer *diphenylene oxide* dari aerosol, pelapisan ulang pada setiap sisi aktif yang dapat terbentuk selama proses pemanasan dan pastikan bahwa polimer sepenuhnya tertutup dalam daerah yang dipanaskan dari penjerap, sehingga menghilangkan potensi terjadinya titik dingin. Sebagai alternatif, *silanized glass wool* dapat digunakan sebagai pengatur jarak pada *inlet* penjerap.

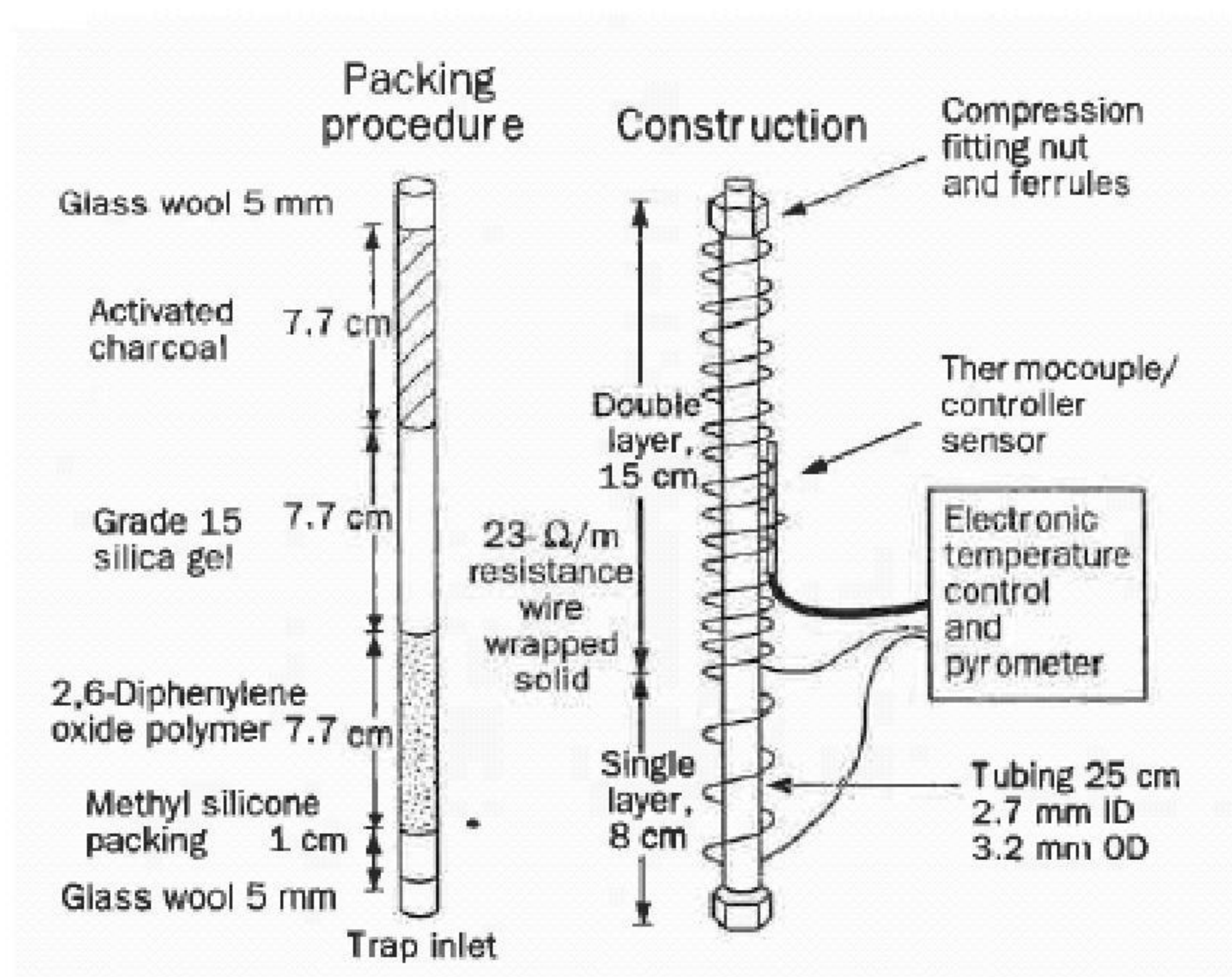
Sebelum pemakaian awal, kondisikan penjerap semalaman sesuai dengan instruksi pabrik pembuat. Lepaskan lubang keluaran penjerap ke arah ruangan, bukan ke kolom analitik. Sebelum penggunaan rutin, kondisikan penjerap dengan melakukan

pembilasan balik (*back-flushing*) selama 10 menit. Optimalkan ventilasi penjerap untuk kolom analitis selama pengkodisian rutin; Jalankan kolom sesuai dengan program suhu sebelum dilakukan analisis contoh.

- b) Kromatografi gas (GC): gunakan GC dengan suhu yang dapat diprogram, sesuai untuk kolom yang digunakan. nonaktifkan semua komponen kaca (misalnya *injector liners*) dengan *silanizing agent*.
- c) Kolom GC kapiler: Gunakan kolom kapiler yang memenuhi semua kriteria kinerja. Pastikan bahwa laju alir desorpsi sesuai dengan kolom yang dipilih. Empat contoh kolom yang dapat digunakan tercantum di bawah ini dapat pula digunakan kolom lain yang setara:
 - 1) Kolom 1: panjang 60 m × diameter dalam 0,75 mm VOCOL dengan ketebalan film/ketebalan lapisan 1,5 µm
 - 2) Kolom 2: panjang 30 m × diameter dalam 0,53 mm DB-624 dengan ketebalan film/ketebalan lapisan 3 µm
 - 3) Kolom 3: panjang 30 m × diameter dalam 0,32 mm DB-5 dengan ketebalan film/ketebalan lapisan 1 µm
 - 4) Kolom 4: panjang 30 m × diameter dalam 0,25 mm DB-624 dengan ketebalan film/ketebalan lapisan 1,4 µm



Gambar 7 - Alat pembilas (*purging device*)



Gambar 8 - Prosedur dan konstruksi bahan penjerap dengan menyertakan kemampuan *desorpsi* (*desorb capability*)

- d. spektrometer massa
- e) Pembilasan dan penjerap – GC/MS interface
- f) Syringe: 0,5 mL, 1,0 mL, 5 mL dan 25 mL glass hypodermic dengan ujung dapat dilepas.
- g) katup Syringe (Syringe valves), dua arah, dengan ujung dapat dilepas.
- h) Microsyringe, 10 μ L, 25 μ L dan 100 μ L dengan panjang 5 cm, diameter dalam 0,15 mm dan jarum miring/kerucut 220 (bevel needle)
- i) Botol 40 mL bertutup ulir yang dilapisi TFE

3.27.3.1.3 Preaksi

- a) Air untuk preaksi, di mana tidak mengandung senyawa pengganggu yang terlihat pada atau di atas Limit Deteksi Metode / *Methode Detection Limit* (MDL) dari senyawa target (1,2-dichloroethane). Siapkan dengan melewati air melalui wadah filter karbon yang berisi sekitar 0,5 kg karbon aktif, dapat juga dengan penyulingan, atau dengan menggunakan sistem pemurnian air.
- b) bahan penjerap (*trap packing material*):
 - 1) polimer 2,6-diphenylene oxide, 60/80 mesh, derajat kromatografi gas
 - 2) Methyl silicone, 3 OV-1 atau yang setara
 - 3) silica gel, 35/60 mesh
- c) metanol; derajat kromatografi gas
- d) asam klorida: HCl 1 + 1;
- e) vinyl chloride, kemurnian 99,9%;
- f) asam askorbat;
- g) Larutan stok standar:
 - 1) siapkan dari bahan standar murni atau larutan standar bersertifikat yang tersedia secara komersial. Siapkan larutan stok standar dalam metanol menggunakan cairan atau gas yang sesuai.

Hati-hati! bahan beracun.

Masukkan sekitar 9,8 mL metanol di labu ukur 10 mL bertutup kaca. Biarkan tanpa tutup selama sekitar 10 menit atau sampai seluruh metanol yang ada di permukaan gelas menguap. Timbang labu dengan ketelitian mendekati 0,1 mg.

- 2) Tambahkan bahan acuan uji (*reference materials*) dengan cara sebagai berikut: untuk cairan, gunakan *syringe* 100 μL atau pipet kaca sekali pakai, segera tambahkan dua tetes atau lebih bahan acuan uji ke labu, dan timbang kembali. Pastikan bahwa tetesan jatuh langsung ke metanol tanpa menyentuh dinding labu. Untuk gas *halocarbon* yang mempunyai titik didih di bawah 30 °C (*bromomethane*, *chloroethane*, *chloromethane*, *dichlorofluoromethane*, *trichlorofluoromethane*, *vinyl chloride*) pasang tabung plastik *vinyl* ke botol gas yang mengandung bahan acuan uji, dengan ujung *pipet* berada di dalam metanol, masukkan jarum 5 mL *valved gastight syringe* (*syringe* kedap gas) ke dalam tabung, dan perlahan tarik gas ke dalam jarum suntik sampai mencapai tanda 5,0 mL. Masukkan ujung *gastight syringe* sekitar 5 mm dari permukaan metanol, dan secara perlahan dorong gas dalam metanol. Gas akan larut dalam metanol dan gas yang larut itu akan terlihat sebagai sebuah pusaran dalam pelarut. Timbang kembali labu (selisih berat adalah banyaknya gas yang terlarut dalam metanol), encerkan sampai tanda tera, tutup dan campur dengan membalikkan beberapa kali. Hitung konsentrasi dalam mikrogram per mikroliter dari perolehan bersih dalam berat. Jika kemurnian senyawa yang diuji 96% atau lebih, hitung konsentrasi stok standar dari berat yang tidak dikoreksi. Direkomendasikan menggunakan stok standar komersial yang disiapkan pada konsentrasi tertentu serta disertifikasi oleh pabrik/pembuatnya atau dari sumber independen. Pindahkan larutan stok standar ke dalam botol bertutup ulir berlapis *TFE*. Simpan dengan *headspace* minimum pada suhu -10 °C sampai -20 °C dan terlindung dari cahaya.
- h) larutan standar sekunder: Gunakan larutan stok standar, siapkan larutan standar sekunder dalam metanol yang mengandung senyawa target yang akan dianalisa, baik secara tunggal, atau dicampur. Siapkan larutan standar sekunder pada konsentrasi yang masuk dalam rentang daerah kerja (*working range*) dalam sistem analitik, sebagai larutan standar kalibrasi (lihat j di bawah). Simpan larutan standar sekunder dengan *headspace* minimum dalam *freezer* dan periksa secara berkala dari kemungkinan menguap (sebagai indikasi perlunya dibuat larutan standar sekunder yang baru atau tidak). Kondisikan dalam suhu ruang sebelum digunakan. Untuk sampel gas, buat standar segar setiap minggu. Ganti semua standar setiap bulan, atau lebih cepat apabila pada saat dibandingkan dengan standar pengecek (*check standards*) menunjukkan adanya suatu masalah.
- i) standar internal/standar pengganti: siapkan larutan yang mengandung *fluorobenzene* (standar internal) dan 1,2-*dichlorobenzene-d₄* (pengganti) dalam metanol. Alternatif standar internal dan standar pengganti dapat digunakan, asalkan sesuai dengan kriteria metode dan tidak mengganggu dengan salah satu analit target (analit yang akan diukur). Buat larutan standar sekunder pada konsentrasi 5 $\mu\text{g/mL}$ dari masing-masing senyawa. Tambahkan 5,0 μL standar ke dalam 25,0 mL contoh atau ke dalam standar kalibrasi yang akan menghasilkan konsentrasi setara dengan 1,0 $\mu\text{g/L}$. Alternatif konsentrasi standar sekunder dapat digunakan jika penambahan volume disesuaikan dan seluruh kriteria standar internal terpenuhi. Tambahkan campuran ini ke masing-masing sampel, standar dan blangko.
- j) standar kalibrasi: Buat paling sedikit lima tingkat konsentrasi untuk masing-masing senyawa dengan menambahkan jumlah yang tepat larutan standar sekunder ke air untuk pereaksi dan contoh air dikocok balik sebanyak dua kali. Siapkan satu standar pada konsentrasi terdekat, tetapi di atas konsentrasi MDL (misalnya 4 \times MDL untuk contoh jenis air minum) atau batas bawah dari rentang kerja dan yang lain sesuai dengan rentang yang diharapkan untuk konsentrasi contoh atau untuk menentukan rentang kerja detektor. Larutan standar kalibrasi bisa disimpan sampai 24 jam apabila disimpan dalam botol kecil/*vial* tertutup dengan *headspace* nol. Jika tidak (*headspace* tidak nol), maka tidak bisa disimpan. Alternatif, buat standar kalibrasi dengan menyuntikkan pelarut pembilas (*flush*) yang sesuai, standar campuran dan standar internal/campuran

pengganti, secara langsung ke dalam *syringe* 25 mL yang berisi air sebagai pereaksi; segera suntikkan larutan standar ke wadah pembilas (*purge vessel*).

3.27.3.1.4 Cara Kerja

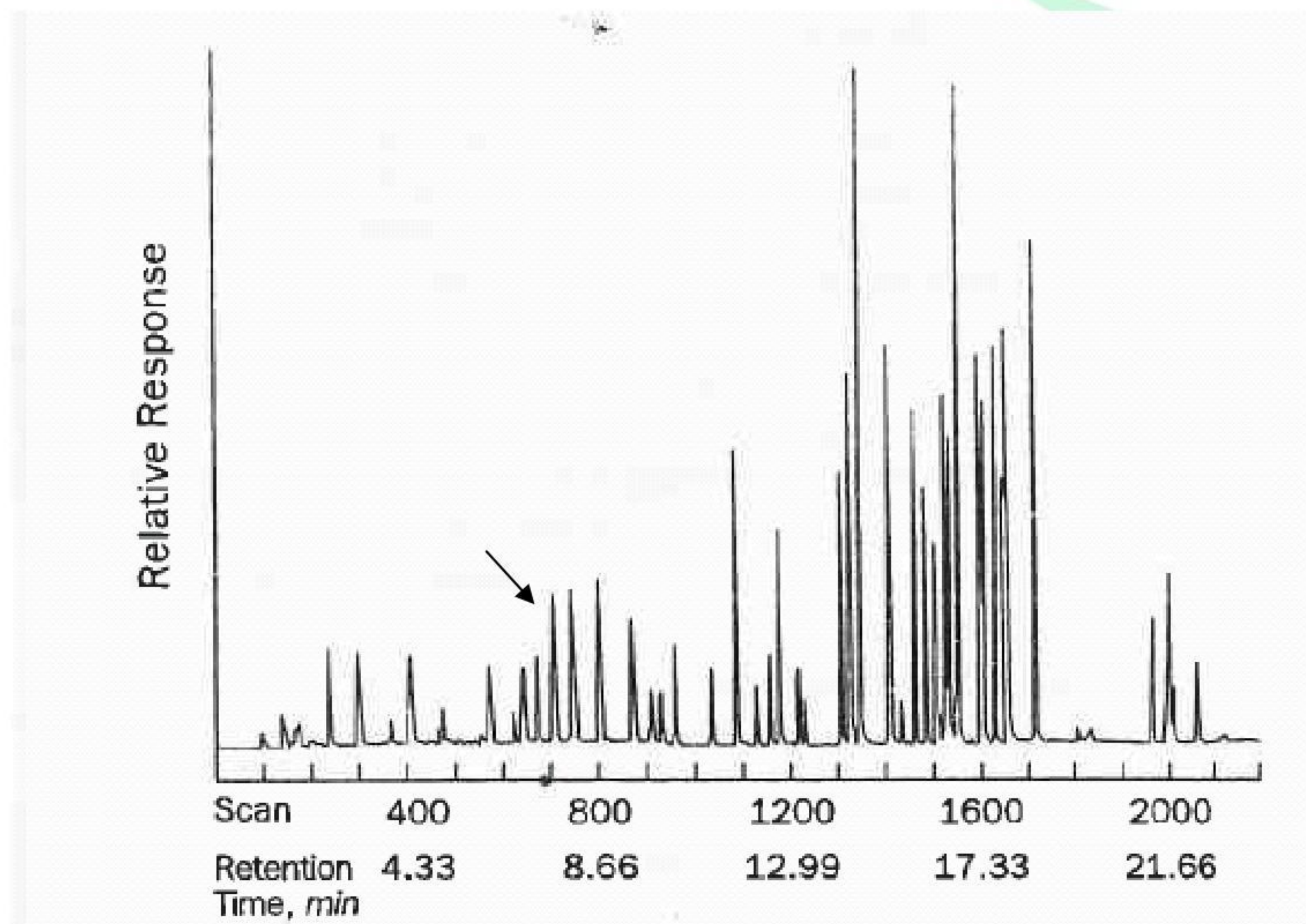
- a) kondisi operasi: Tabel 8 menyediakan kondisi operasi disarankan untuk kromatografi gas dan memberikan perkiraan waktu retensi MDL yang dapat dicapai pada kondisi ini

Tabel 8 – Ion primer kuantitatif, waktu retensi dan tingkat deteksi metode/*method detection level* (MDL)

| Analit | Waktu retensi menit | MDL µg/L | Ion Primer/ Ion utama m/z |
|--------------------|------------------------|-------------|------------------------------|
| 1,2-dichloroethane | 8,14 | 0,055 | 62 |

Kondisi GC: kolom J & W DB-624, 30 m, 0,25 mm ID, 1,4 µm ketebalan lapisan tipis/film; program suhu: 35 °C, 4 menit; 4 °C/menit; 50 °C, 0 menit; 10 °C/menit; 175 °C, 4 menit.

Contoh pemisahan didapat dengan kolom yang ditentukan pada Tabel 8, ditunjukkan pada Gambar 9. Kolom kromatografi atau kondisi lainnya dapat digunakan apabila kriteria pengendalian mutu terpenuhi.



Gambar 9 - Kromatogram GC/MS 1,2-dichloroethane. Kondisi GC: kolom J & W DB-624, 30 m, 0,25 mm ID, 1,4 µm ketebalan lapisan tipis/film; program suhu: 35 °C, 4 menit; 4 °C/menit; 50 °C, 0 menit; 10 °C/menit; 175 °C, 4 menit.

- b) Uji kinerja GC/MS: pada setiap awal periode 12 jam di saat analisis dilakukan, periksa sistem GC/MS melalui uji kinerja dengan 4-bromofluorobenzene (BFB) sebelum dilakukan analisis terhadap contoh, blangko atau standar. Uji kinerja mensyaratkan parameter instrumen sebagai berikut :

| | |
|-----------------|---|
| Energi electron | 70 eV (nominal) |
| Kisaran massa | 35 amu sampai 300 amu |
| Waktu scan | Paling sedikit 5 scan / puncak tetapi tidak lebih dari 2 detik / scan |

Suntikkan 25 ng BFB langsung pada kolom GC. Kalau penyuntikan langsung tidak mudah dilakukan, tambahkan 1 µL larutan BFB 25 µg/mL ke dalam 25 mL air dalam *syringe* yang digunakan untuk memindahkan contoh ke alat pembilas dan lakukan analisis seperti halnya pada contoh uji. Dapatkan spektrum massa BFB yang sudah terkoreksi dan pastikan bahwa semua kriteria *m/z* dalam Tabel 9 terpenuhi. Jika semua kriteria tersebut tidak tercapai, ulang penyetelan spektrometer massa dan uji ulang sampai semua kriteria terpenuhi.

Tabel 9 - Kunci BFB *m / z* kriteria kelimpahan (*abundance criteria*)

| Massa | <i>m/z abundance criteria</i> |
|-------|---|
| 50 | 15 % sampai 40 % dari massa 95 |
| 75 | 30 % sampai 60 % dari massa 95 |
| 95 | puncak dasar, kelimpahan relative 100 % |
| 96 | 5 % sampai 9 % dari massa 95 |
| 173 | < 2 % dari massa 174 |
| 174 | >50 % dari massa 95 |
| 175 | 5 % sampai 9 % dari massa 174 |
| 176 | 95 % sampai 101 % dari massa 174 |
| 177 | 5 % sampai 9 % dari massa 176 |

c) Kalibrasi: lakukan kalibrasi sebagai berikut:

- 1) pengaturan sistem – Tahap awal kondisikan penjerap semalaman pada 180 °C dengan pembilasan balik menggunakan gas inert dengan kecepatan alir 20 mL/menit. Secara rutin kondisikan penjerap selama 10 menit pada suhu yang disarankan produsen/pabrik. Kondisikan sistem pembilasan dan penjerap dengan GC menggunakan program suhu dan kondisi laju aliran yang disarankan. Kalibrasikan sistem, baik dengan teknik standar internal atau eksternal.
- 2) Teknik kalibrasi standar internal: pilih satu atau lebih standar internal yang sama/setara dalam perilaku analitis terhadap senyawa target. *Fluorobenzene* adalah senyawa yang disarankan untuk standar internal. Tunjukkan bahwa pengukuran standar internal tidak dipengaruhi oleh metode atau gangguan matriks. Apabila tidak ada standar internal yang dapat diaplikasikan, senyawa = pengganti (*1,2-dichlorobenzene-d₄*), dapat digunakan sebagai pengganti standar internal. Buat standar kalibrasi pada minimum 5 tingkat konsentrasi. Seperti yang dijelaskan dalam 3.27.3.1.3.j di atas. Buat larutan standar sekunder masing-masing mengandung standar internal (3.27.3.1.3.i di atas). Analisis masing-masing standar kalibrasi sesuai prosedur untuk contoh, tambahkan larutan standar internal langsung ke *syringe*. Tabulasikan tinggi puncak atau area respon terhadap konsentrasi dan hitung *response factor* (RF) senyawa dalam standar kalibrasi sebagai berikut:

$$RF = \frac{(As)(Cis)}{(Ais)(Cs)}$$

Keterangan:

- As = respon untuk senyawa yang diukur
Ais = respon untuk standar internal
Cis = konsentrasi untuk standar internal
Cs = konsentrasi untuk senyawa yang diukur

Hitung % RSD untuk rata-rata RFs untuk masing-masing senyawa. Rata-rata RF dapat digunakan jika RSD kurang dari 20%

- 3) Teknik kalibrasi standar eksternal: buat standar seperti yang diuraikan pada 3.27.3.1.3.j. Analisis masing-masing standar kalibrasi dan tabulasikan respon tinggi atau area puncak terhadap konsentrasi dan buat kurva kalibrasi.

- 4) Pengecekan kalibrasi

kalibrasi berkelanjutan – kalibrasi berkelanjutan/*continuing calibration* (CCAL) merupakan analisis secara berkala standar kalibrasi yang digunakan untuk memastikan bahwa respon alat tidak berubah secara signifikan dari kalibrasi awal. Lakukan kalibrasi berkelanjutan setiap 10 contoh untuk analisis GC, setiap 20 contoh untuk analisis GC/MS atau setiap 12 jam, mana saja yang lebih sering terjadi. Lakukan kalibrasi berkelanjutan dengan satu atau lebih konsentrasi standar analisis dalam kalibrasi awal. Konsentrasi yang sebenarnya berbeda dari standar kalibrasi berkelanjutan selama rentang kalibrasi, dengan konsentrasi minimum lebih besar dari dua kali dari batas pelaporan. Kriteria keberterimaan perolehan kembali untuk kalibrasi berkelanjutan adalah 70 % sampai 130 % dibandingkan dengan nilai yang diketahui atau diharapkan dari standar kalibrasi (kriteria keberterimaan perolehan kembali untuk gas dapat diperluas menjadi 60 % sampai 140 %). Jika kriteria keberterimaan tidak terpenuhi, lakukan analisis ulang standar kalibrasi berkelanjutan atau ulangi kalibrasi awal. Saat menggunakan faktor respons, periksa kinerja atau sensitivitas alat untuk analit target terhadap nilai keberterimaan minimum untuk faktor respon

- d) Analisis contoh

- 1) Kondisikan contoh pada suhu ruang. Ambil syringe 25 mL lepaskan bagian pendorong dan tutup bagian *injection valve*. Buka botol sampel dan tuang kedalam syringe sampai penuh, sedikit berlebih. Pasang pendorong dan buang udara dan tepatkan sampai volume 25 mL. Lakukan duplo jika contoh cukup tersedia (sekali tutup contoh telah dibuka, contoh tidak dapat disimpan, sebab ada *headspace*). Tambahkan dengan jumlah yang tepat standar pengganti/standar internal melalui lubang klep dan tutup klep. Pasang alat untuk memurnikan, buka katup dan suntikkan contoh ke dalam wadah pemurnian. Tutup katup dan murnikan contoh selama 11,0 menit pada suhu kamar dengan kecepatan alir 40 mL/menit (helium atau nitrogen). Jika uap air menyebabkan masalah di dalam spektrometer massa, gunakan pemurnian kering 3 menit dan/atau modul pengontrol kelembaban.
- 2) Desorpsi bahan yang terjerap ke kepala kolom kromatografi pada 180 °C sambil pembilasan balik penjerap selama 4 menit dengan gas inert sesuai dengan kolom yang digunakan dan memulai memprogram suhu GC. (kecepatan alir jadi laju alir)
- 3) Atur sistem *automatic drain* untuk mengosongkan ruang pembilas selama bahan yang terjerap terdesorpsi kedalam GC atau alternatif, gunakan syringe untuk mengosongkan wadah. Pastikan semua area yang dibasahi selama pembilasan (*purging*) juga terbasahi selama pencucian.
- 4) Aktifkan kembali penjerap dengan pemanasan pada suhu yang sesuai selama 5 - 7 menit. Biarkan penjerap dingin sampai suhu kamar sebelum memasukkan contoh berikutnya ke wadah pembilasan (*purging*). Ketika semua senyawa contoh telah dielus dari kolom kromatografi, akhiri akuisisi data dan simpan file data. Gunakan sistem perangkat lunak data untuk menampilkan spektrum massa yang lengkap dan *extracted ion current profiles* (EICP). Jika ada kelimpahan ion melebihi sistem daerah kerja, encerkan contoh dengan air dan lakukan prosedur analisis dari awal.

CATATAN hati-hati dengan contoh karena senyawa bisa mudah menguap dan dapat hilang jika contoh dibuka kembali.

Perkirakan jumlah pengenceran yang dibutuhkan dan keluarkan kelebihan contoh dari syringe kedua. Injeksikan bagian itu ke dalam wadah pembilasan (*purge vessel*) dan syringe kedua tambahkan air sampai dengan total volume 25,0 mL dalam wadah pembilasan (*purge vessel*).

3.27.3.1.5 Perhitungan

Ketika senyawa telah diidentifikasi, berdasarkan kuantifikasi integrasi area EICP menggunakan ion utama m/z seperti yang diberikan dalam Tabel 8. Jika contoh menghasilkan ion pengganggu pada m/z ion utama, hitung *response factor* atau kurva kalibrasi menggunakan ion sekunder m/z dan gunakan m/z sekunder untuk kuantifikasi. Laporkan hasil dalam mikrogram per liter. Laporkan semua data pengawasan mutu bersama hasil contoh

Perhitungan hasil (jika menggunakan teknik standar internal):

$$\text{Konsentrasi, } \mu\text{g/L} = \frac{A_s \times C_{is}}{A_{is} \times \text{RF}}$$

Keterangan :

A_s = Area/respon dari senyawa yang diukur
 A_{is} = Area/respon dari internal standar
 RF = *Respon Factor*

Jika menggunakan teknik standar eksternal hitung konsentrasi dari luas puncak yang dihasilkan dengan menggunakan kurva kalibrasi.

3.27.4 Minyak mineral

3.27.4.1 Istilah dan definisi

3.27.4.1.1 Indeks minyak hidrokarbon dengan metode gas chromatography- *flame ionization detector* (GC-FID)

Penjumlahan konsentrasi senyawa yang dapat diekstrak dengan pelarut hidrokarbon, titik didih antara 36 °C dan 69 °C, tidak terserap pada *Florisil*^{*)} dan yang dapat dikromatografikan dengan waktu retensi antara *n-decane* ($C_{10}H_{22}$) dan *n-tetracontane* ($C_{40}H_{82}$).

CATATAN zat yang memenuhi definisi ini adalah rantai panjang atau bercabang alifatik, alisiklik, aromatik atau hidrokarbon aromatik alkil-tersubstitusi.

^{*)}Florisil adalah nama dagang untuk tanah diatom yang sudah siap pakai, terutama terdiri dari magnesium silikat anhidrat. Informasi ini diberikan untuk kemudahan pengguna standar ini dan bukan merupakan keharusan menggunakan produk ini.

3.27.4.2 Prinsip

Contoh air diekstraksi dengan zat pengeksraksi. Substansi polar dihilangkan dengan *clean-up* pada *Florisil*. *Aliquot* yang dimurnikan dianalisis dengan kromatografi kapiler menggunakan kolom non-polar dan *flame ionization detector* (FID). Luas puncak total antara *n-decane* dan *n-tetracontane* diukur. Minyak mineral dihitung konsentrasinya berdasarkan standar eksternal yang terdiri dari dua minyak mineral yang telah ditentukan dan selanjutnya indeks minyak hidrokarbon dihitung.

3.27.4.3 Pereaksi

Semua pereaksi harus derajat pereaksi dan cocok untuk tujuan yang spesifik. Pereaksi dan larutan yang sesuai harus diperiksa dengan melakukan uji blangko.

- a) Air untuk pembuatan larutan;
Air suling atau air hasil dari generator pemurni air yang mampu menghilangkan organik dalam jumlah yang sedikit, misalnya menggunakan karbon aktif.
 - b) larutan pengestraksi;
Pelarut hidrokarbon tunggal atau campuran hidrokarbon, kisaran titik didih 36 °C sampai 69 °C. Jika terjadi perubahan zat pengestraksi, diperlukan pengulangan pengujian;
 - c) natrium sulfat anhidrat, Na_2SO_4 ;
 - d) magnesium sulfat heptahidrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
 - e) asam mineral, misalnya asam klorida, HCl 12 M ($\rho = 1,19 \text{ g/mL}$);
 - f) aseton, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$;
 - g) Florisil, ukuran butir 150 μm sampai 250 μm (60 mesh sampai 100 mesh), panaskan sampai 140 °C selama 16 jam dan simpan dalam desikator; untuk uji kelayakan florisil apabila diperlukan dapat mengacu pada ISO 9377-2:2000 pasal 9.6
 - h) campuran minyak mineral;
 - 1) Campuran standar
Timbang seksama jumlah yang sama dari dua jenis minyak mineral yang berbeda (jenis A dan jenis B, keduanya tidak mengandung bahan tambahan) dan tambahkan larutan pengestraksi yang cukup untuk memberikan konsentrasi hidrokarbon total sekitar 10 mg / mL
Jenis A harus memperlihatkan puncak berlainan/terpisah pada kromatogram gas. Salah satu contohnya adalah bahan bakar solar tanpa bahan tambahan. Jenis B harus mempunyai rentang titik didih lebih tinggi daripada jenis A dan harus memiliki sinyal belum terpecahkan pada kromatogram gas. Contoh dari jenis ini adalah pelumas tanpa bahan tambahan, kisaran titik didih 325 °C sampai 460 °C.
 - 2) Campuran kalibrasi
Siapkan paling sedikit lima larutan kalibrasi yang berbeda dengan mengencerkan *larutan* campuran standar dengan larutan pengestraksi (3.27.4.3.b). Konsentrasi berikut ini mungkin sesuai 0 (blangko), 0,2 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,8 mg/mL dan 1,0 mg/mL.
untuk aplikasi yang lain dapat digunakan konsentrasi yang lebih tinggi. Simpan campuran kalibrasi pada kondisi tertutup rapat di dalam lemari es (4 °C sampai 8 °C). Campuran kalibrasi stabil sampai dengan enam bulan.
 - 3) Standar pengawasan mutu
Siapkan larutan standar dalam aseton dengan konsentrasi massa misalnya 1 mg/mL.
- CATATAN** apabila menggunakan pelumas untuk pengawasan mutu, larutan stok disiapkan dalam larutan pengestraksi, selanjutnya diencerkan dalam aseton sekitar sepuluh kali sebelum menambahkan (*spike*) air yang digunakan untuk pengawasan mutu. Simpan larutan pada kondisi tertutup rapat di dalam lemari es (4 °C sampai 8 °C). Larutan stabil sampai dengan enam bulan.
- i) Campuran standar dari n-alkana untuk uji kinerja system;
Larutkan n-alkana dengan nomor karbon genap (C_{20} , C_{40} dan paling sedikit tiga n-alkana lagi) dalam larutan pengestraksi sehingga konsentrasi dari masing-masing komponen sekitar 50 $\mu\text{g/L}$. Mungkin perlu untuk menggunakan pelarut yang berbeda, misalnya heptana, untuk larutan pertama; dalam hal ini encerkan larutan pertama ini dengan zat pengestraksi (3.27.4.3.b). Simpan campuran standar pada kondisi tertutup rapat di dalam lemari es. Larutan stabil sampai dengan enam bulan.

CATATAN 1 larutan ini digunakan untuk memverifikasi kesesuaian sistem kromatografi gas untuk resolusi n-alkana serta respon detector

CATATAN 2 Larutan ini digunakan untuk memberikan informasi tentang waktu retensi dari n-alkana untuk mengecek karakteristik hidrokarbon dalam contoh

j) senyawa pembanding/ acuan / *reference compounds*;

- 1) n-Dekana, $C_{10}H_{22}$
- 2) n-Tetrakontana, $C_{40}H_{82}$
- 3) n-Eikosana, $C_{20}H_{42}$

k) Pelarut ekstraksi yang mengandung senyawa pembanding;

1) Larutan stok pelarut ekstraksi

Larutkan 20 mg n-Tetrakontana, $C_{40}H_{82}$ dalam zat pengekstraksi. Kemudian tambahkan 20 μ L n-Dekana, $C_{10}H_{22}$ dan encerkan dengan zat pengekstraksi (3.27.4.3.b) sampai 1 000 mL. Simpan pada kondisi tertutup rapat di dalam lemari es. Larutan stabil sampai dengan enam bulan.

CATATAN n-Tetrakontana, $C_{40}H_{82}$ kelarutannya sedang dalam zat pengekstraksi. Sedikit pemanasan atau perlakuan dengan ultrasonik dapat mempercepat proses pelarutan

2) Larutan standar pelarut ekstraksi

segera sebelum digunakan, encerkan larutan stok (lihat 3.27.4.3.k.1) dengan sepuluh kali larutan pengekstraksi (3.27.4.3.b)

l) Larutan uji stearil stearat, $C_{36}H_{72}O_2$

Larutkan 200 mg stearil stearat, $C_{36}H_{72}O_2$ dalam 100 mL Larutan standar pelarut ekstraksi (3.27.4.3.k.2)

CATATAN Larutan ini digunakan untuk memeriksa efisiensi dari prosedur *clean-up*. Simpan larutan pada kondisi tertutup rapat di dalam lemari es. Larutan stabil sampai dengan enam bulan.

3.27.4.4 Peralatan

a) Peralatan gelas laboratorium;

Cuci semua peralatan gelas dengan prosedur untuk jenis analisis ini dan periksa kemurniannya (pengukuran blangko). Bila diperlukan, bilas peralatan gelas dengan zat pengekstraksi dan ukur kembali blangko.

b) kromatograf gas, dilengkapi dengan sistem injeksi dan detektor ionisasi nyala (*FID*);

c) kolom untuk kromatografi gas, *fused silica*, dengan salah satu fase diam berikut:

Non-polar, immobilized dimethylpolysiloxane 100 % atau *dimethyl* 95%/
diphenylpolysiloxane 5% atau *polymer siloxane* yang dimodifikasi.
dengan ukuran:

Panjang 5 m sampai 30 m

diameter dalam 0,25 mm sampai 0,53 mm

ketebalan lapisan/film 0,25 μ m sampai 1,2 μ m

direkomendasikan untuk menggunakan prakolom, misalnya *deactivated fused silica* dengan ukuran panjang 2 m dan diameter dalam 0,53 mm.

d) Sistem data, untuk menghitung luas area puncak dalam kromatogram ;

e) botol contoh, berbahan gelas, dengan *ground glass stopper* kapasitas 250 mL dan 1 000 mL atau dengan tutup ulir yang dilapisi dengan *PTFE* (*polytetrafluoroethene*). botol contoh harus memungkinkan ekstraksi langsung dari botol;

f) alat sentrifugasi (*centrifuge*);

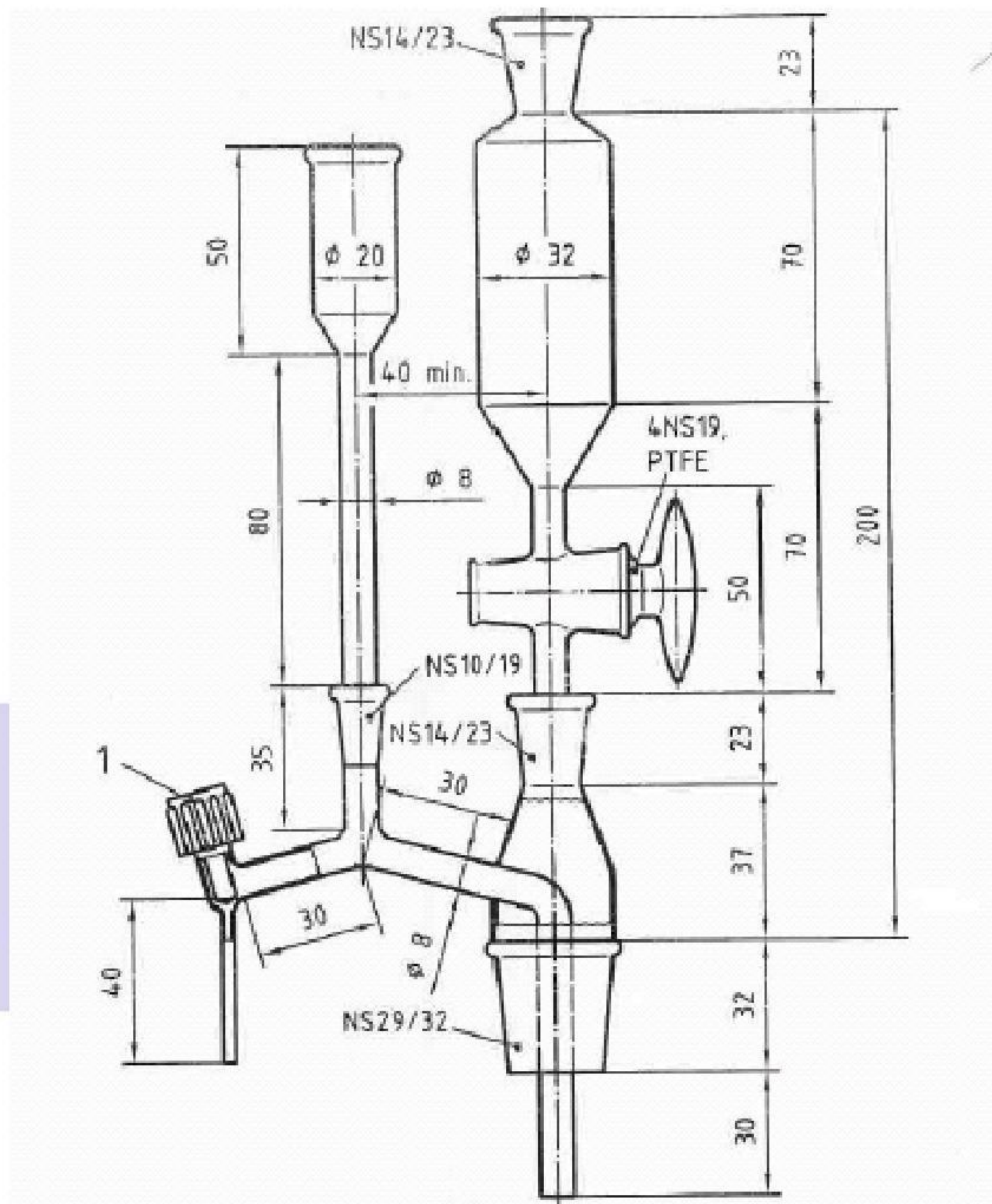
g) tabung sentrifugasi, kapasitas 100 mL, dengan tutup yang cocok (ulir)

h) mikroseparator, sebagai contoh lihat Gambar 10 atau alat lain yang cocok untuk pemisahan fase

i) kolom *clean-up*, dibuat dari kaca, *frit of sinter* dengan porositas 2, misalnya lihat

Gambar 11

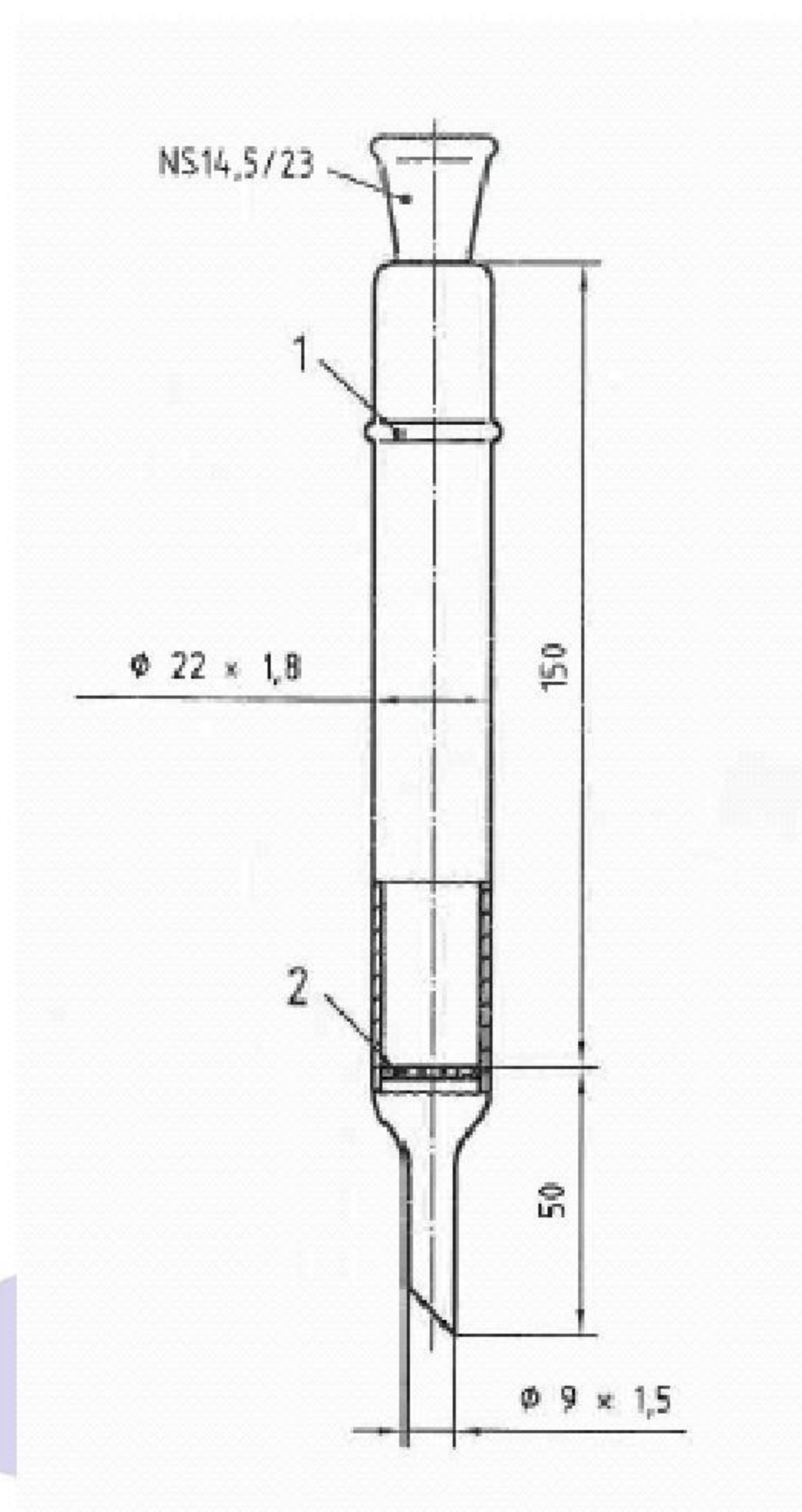
- j) peralatan *Kuderna Danish*, dengan labu 250 mL atau peralatan pemekat yang lain yang sesuai, misalnya *rotary evaporator* dengan vakum yang terkontrol
- k) *magnetic stirrer* dengan panjang yang sesuai untuk menjamin pencampuran

**Keterangan:**

Dimensi dalam millimeter

1. *Spindle stopcock, PTFE***Gambar 10 – Mikroseparator****3.27.4.5 Pengambilan dan preservasi contoh**

Isi botol pengambilan contoh sampai sekitar 90 % dengan contoh, tutup rapat dan timbang (m_1). Simpan contoh pada suhu 4 °C dan ekstraksi contoh secepat mungkin, dalam beberapa kasus bisa disimpan dalam waktu empat hari. Jika perlu, lakukan preservasi contoh dengan mengasamkan menggunakan asam mineral sampai pH 2;

**Keterangan:**

Dimensi dalam millimeter

1. Gas bulb

2. Fritted glass filter

Gambar 11 – Contoh kolom *clean-up***3.27.4.6 Cara kerja****3.27.4.6.1 Uji blangko**

Lakukan uji blangko masing-masing dengan serangkaian pengujian sesuai dengan prosedur ekstraksi (lihat 3.27.4.6.3), termasuk semua pereaksi dan peralatan gelas dengan cara yang sama seperti contoh

3.27.4.6.2 Penentuan perolehan kembali (*recovery*)

Tentukan perolehan kembali (*recovery*) secara berkala, sebaiknya dalam setiap rangkaian pengujian, Gunakan 900 mL air yang telah ditambah 1,0 mL standar pengawasan mutu (lihat 3.27.4.3.h.3). Lakukan pengujian dimulai dengan (3.27.4.6.3) dan hitung perolehan kembali. Pastikan bahwa perolehan kembali di antara 80 % dan 110 %.

3.27.4.6.3 Prosedur ekstraksi

- a) Bila perlu, dinginkan contoh sampai 10 °C, untuk mencegah kehilangan larutan pengestraksi oleh penguapan

- b) Asamkan contoh sampai pH 2 dengan menambahkan asam mineral, jika hal ini tidak dilakukan pada saat penyimpanan contoh (lihat sub pasal 3.27.4.5 pengambilan dan preservasi contoh)

CATATAN 1 tambahkan 80 g magnesium sulfat per 900 mL contoh untuk mencegah emulsi, penambahan magnesium sulfat tidak diperlukan kalau diketahui contoh tidak membentuk emulsi

- c) Tambahkan 50 mL larutan standar pelarut ekstraksi (lihat sub pasal 3.27.4.3.k.2) dan pengaduk magnet (*magnetic stirrer*), selanjutnya tutup botol dan aduk dengan cepat selama 30 menit. Buka tutupnya dan ganti tutupnya dengan mikroseparator. Tambahkan air secukupnya untuk mengeluarkan lapisan larutan pengestraksi dari mikroseparator, pindahkan lapisan larutan pengestraksi ke kolom *clean-up* dan lanjutkan sesuai prosedur *clean up*
- d) Pada saat memindahkan fase organik ke kolom *clean-up* lakukan dengan hati-hati, untuk menghindari ikut terbawanya air karena hal ini akan melapisi permukaan natrium sulfat. dianjurkan untuk memindahkan lapisan organik melalui beberapa tahap dengan menggunakan pipet atau menggunakan mikroseparator (Gambar 10) posisikan meniskus di bawah keran

CATATAN 2 pada kasus emulsi yang kuat, sentrifugasi hasil ekstraksi dengan cara sebagai berikut: pindahkan fase zat pengestraksi bersama dengan emulsi ke dalam tabung sentrifugasi 100 mL dan tutup tabung. pecahkan emulsi dengan mensentrifugasi hasil ekstraksi tersebut selama 10 menit sampai 15 menit

- e) ekstraksi bisa dilakukan tanpa menggunakan *magnetic stirrer* (dengan cara mengocok), akan tetapi perlu diperiksa efisiensinya

3.27.4.6.4 Prosedur *clean-up*

- a) Pindahkan fase larutan pengestraksi ke dalam kolom kecil (lihat Gambar 10) isi dengan 2 g *Florisil* dan tutup dengan lapisan 2 g natrium sulfat anhidrat

CATATAN 1 sebelumnya bilas kolom dengan beberapa milliliter larutan pengestraksi dapat bermanfaat untuk mencegah terbentuknya saluran pada dinding kolom.

- b) Lanjutkan dengan penambahan 10 mL larutan pengestraksi, alirkan melalui kolom ke dalam alat pemekat yang sesuai (Kuderna Danish)
- c) Bilas kolom dengan 10 mL larutan pengestraksi

CATATAN 2 prosedur *clean up* yang lain dapat dengan menggunakan 2 g *florisil* selama 30 menit dengan alat pengocok (*shaker*), alternatif ini memberikan hasil yang setara dengan kolom pengujian *florisil*

3.27.4.6.5 Pemekatan

- a) Gunakan peralatan Kuderna Danish, pekatkan hasil ekstraksi sampai volume sekitar 6 mL
- b) Pekatkan dengan hati-hati hasil ekstraksi lebih lanjut sampai kurang dari 1 mL menggunakan aliran nitrogen. Tepatkan sampai volume 1 mL dengan larutan pengestraksi atau hitung volume hasil ekstraksi yang sudah dipekatkan dengan tepat dengan cara menimbang. Pindahkan hasil ekstraksi akhir ke dalam *septum vial* untuk analisis kromatografi gas.

CATATAN konsentrasi ekstrak untuk 1 mL hasil ekstraksi dapat diabaikan jika diperkirakan indeks minyak hidrokarbon tinggi, misalnya 100 μL , dari sebagian atau hasil ekstraksi yang tidak dipekatkan diinjeksikan dengan cara "*large volume injection system*"

- c) ketika menggunakan *large volume injection system*, maka perlu membuat hasil ekstraksi ke volume yang diketahui, misalnya 50 mL atau 100 mL setelah perlakuan dengan *Florisil*.

Dalam hal ini konsentrasi larutan kalibrasi dan campuran kalibrasi n-alkana harus disesuaikan menjadi lebih rendah

- d) biarkan botol contoh kosong ditiriskan selama 5 menit. Timbang botol contoh dengan tutupnya dengan akurasi/ketepatan 1 g (m_2)

3.27.4.6.6 Penentuan dengan kromatografi gas

3.27.4.6.6.1 Pengaturan kromatografi gas

- a) Pilih kolom kapiler dengan salah satu fase diam yang ditentukan (lihat sub pasal 3.27.4.4.c dan Tabel 10) untuk analisis kromatografi gas. Atur kromatografi gas sampai diperoleh pemisahan optimum. Puncak dalam kromatografi gas dari campuran standar n-alkana harus terpisah sempurna. Respon relatif (Luas puncak) dari *n-tetracontane* ($C_{40}H_{82}$) dibandingkan dengan *n-eicosane* ($C_{20}H_{42}$) harus lebih besar atau sama dengan 0,8. Jika tidak, berarti pemisahan dari sistem injeksi terlalu tinggi dan sistem injeksi harus dioptimalkan atau diganti

Contoh kondisi kromatografi gas standar minyak mineral pada contoh air, ditampilkan sesuai Tabel 10.

Tabel 10 – Contoh kondisi kromatografi gas dari standar minyak mineral pada contoh air

| | |
|--|---|
| Teknik penyuntikan | suhu penguapan yang diprogram |
| Suhu penyuntikan | 50 °C sampai 300 °C |
| Volume penyuntikan | 1 µL |
| Panjang kolom | 30 m |
| Diameter dalam kolom | 0,25 mm |
| Fase cair | DB 5 MS |
| ketebalan film/Lapisan | 0,25 µm |
| <i>Pre-column</i> | Kapiler leburan silika yang tidak diaktifkan |
| gas pembawa | Hidrogen |
| Tekanan gas pembawa | 0,8 bar |
| Program suhu oven | 40 °C selama 5 menit, 10 °C/menit sampai 300 °C, 300 °C selama 20 menit |
| detector | detektor ionisasi nyala |
| Suhu detector | 300 °C |
| Gas penyusun (make-up gas) | Nitrogen |
| Aliran Gas penyusun (make-up gas flow) | 25 mL |

3.27.4.6.6.2 Kalibrasi

3.27.4.6.6.2.1 Umum

- a) Untuk kalibrasi perbedaan dibuat antara kalibrasi awal, kalibrasi kerja dan pengecekan kebenaran kurva kalibrasi. Kalibrasi awal menentukan rentang kerja dan linieritas dari fungsi kalibrasi. Lakukan kalibrasi ini jika peralatan dipakai untuk pertama kalinya.
- b) Pada tahap selanjutnya tetapkan rentang kerja akhir dan lakukan kalibrasi rutin. Ulangi kalibrasi ini setelah perawatan (misalnya penggantian kolom kapiler), setelah perbaikan sistem kromatografi gas dan jika terjadi sistem tersebut tidak digunakan untuk jangka waktu yang lama atau apabila patokan validitas tidak dapat dipenuhi. Periksa validitas kalibrasi awal dengan setiap rangkaian contoh yang akan dianalisis.
- c) Koreksi semua kromatogram untuk *column bleeding*, untuk tujuan ini gunakan kromatogram blangko (kromatogram hanya dengan pelarut) dan gunakan ini sebagai dasar koreksi.

3.27.4.6.6.2.2 Kalibrasi awal

Tetapkan rentang kerja awal dengan menganalisis paling sedikit lima pengenceran dari standar kalibrasi campuran uji linieritasnya.

3.27.4.6.6.2.3 Kalibrasi rutin

Setelah memeriksa rentang kerja akhir, analisis minimal lima pengenceran standar kalibrasi campuran, hitung fungsi kalibrasi dengan analisis regresi linier dari daerah puncak yang sudah dikoreksi. Sensitivitas sebenarnya dari metode ini dapat diperkirakan dari perhitungan fungsi regresi.

3.27.4.6.6.2.4 Memeriksa validitas fungsi kalibrasi

- Periksa validitas fungsi kalibrasi dari kalibrasi rutin terhadap masing-masing *batch* contoh dengan menganalisis satu larutan standar setiap kali selesai sepuluh contoh. Konsentrasi larutan standar ini harus terletak antara 40 % dan 80 % dari rentang kerja. pastikan bahwa hasil masing-masing contoh tidak menyimpang lebih dari 10% dari garis kalibrasi kerja. Apabila patokan ini terpenuhi, dianggap kalibrasi tersebut valid. Apabila tidak tercapai lakukan kalibrasi ulang sesuai dengan kalibrasi rutin.
- Untuk jumlah *batch* contoh yang besar analisis dari larutan standar dapat dikurangi, dengan syarat bahwa paling sedikit tiga pengukuran diperoleh untuk menghitung hasil rata-rata.

3.27.4.6.7 Pengukuran

- Ukur contoh, larutan kalibrasi dan larutan blangko dengan kromatografi gas.
- Pastikan kondisi analisis yang sama antara larutan pengekstraksi dengan contoh, gunakan kromatogram larutan pengekstraksi untuk mengoreksi daerah kromatogram contoh.

CATATAN meningkatnya *column bleeding* dapat menunjukkan kontaminasi dari sistem penyuntikan atau kolom

3.27.4.6.8 Parameter integrasi

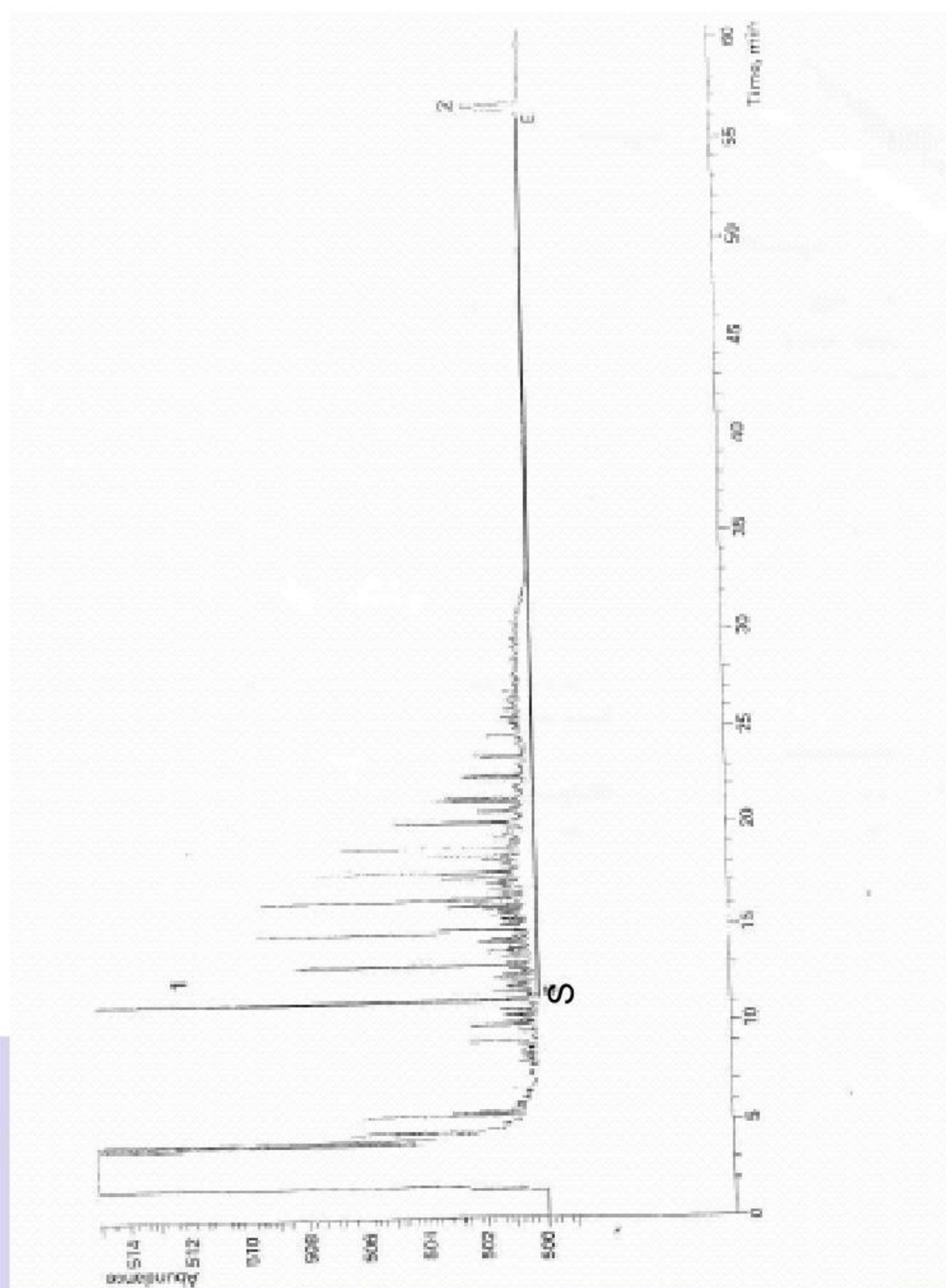
a) Integrasi kromatogram gas antara *n-decane* ($C_{10}H_{22}$) dan *n-tetracontane* ($C_{40}H_{82}$).

Integrasi dimulai segera setelah puncak sinyal *n-decane* berada di depan puncak sinyal pelarut (S dalam Gambar 12). Integrasi diakhiri tepat sebelum puncak sinyal *n-tetracontane* (E dalam Gambar 12). Periksa semua kromatogram secara visual untuk memastikan integrasi yang benar. Tarik garis lurus dari S ke E. Tandai integrasi awal dan akhir dari kromatogram.

CATATAN 1 Sebagai contoh kromatogram, Gambar 12

- adanya puncak antara puncak pelarut dan *n-decane* menunjukkan bahwa contoh mungkin mengandung hidrokarbon dengan titik didih rendah yang mudah menguap. Hal ini harus disebutkan dalam laporan uji.
- puncak terpisah atau peningkatan *baseline* pada akhir kromatogram (waktu retensi lebih besar dari *n-tetracontane*) menunjukkan bahwa contoh mungkin mengandung hidrokarbon dengan titik didih tinggi. Hal ini harus disebutkan dalam laporan uji.

CATATAN berbagai/kisaran angka karbon dari n-alkana yang ada dalam contoh ditentukan dengan membandingkan kromatogram gas dari ekstrak contoh dengan larutan standar n-alkana (lihat sub pasal 3.27.4.3.i) kisaran titik didih yang sesuai dapat diperoleh dari Tabel 11.

**Keterangan:**

1. *n*-decane
2. *n*-tetracontane

Gambar 12 - Kromatogram gas larutan standar (0,5 mg/L)

3.27.4.7 Perhitungan

Hitung indeks minyak hidrokarbon dengan menggunakan persamaan

$$p = \frac{(A_m - b) \cdot f \cdot V \cdot w}{a \cdot (m_1 - m_2)}$$

Keterangan:

- p* indeks minyak hidrokarbon, dalam milligram per liter
a *slope* fungsi kalibrasi, dalam liter per milligram
A_m daerah puncak terintegrasi dari ekstrak contoh, dalam unit *instrument-independent*
f faktor pengenceran dari ekstrak contoh
m₁ massa dari botol contoh yang berisi contoh uji, dalam gram
m₂ massa dari botol contoh kosong, dalam gram
w densitas/berat jenis contoh air, dalam gram per milliliter (air uji dapat digunakan 1,00 g/mL)
V volume dari ekstrak akhir, dalam milliliter
b Intersep/ titik potong dari sumbu *y* pada fungsi kalibrasi

3.27.4.8 Pernyataan hasil

Nyatakan konsentrasi minyak mineral dalam air sebagai indeks minyak hidrokarbon, dalam milligrams per liter, sampai dua angka penting.

Contoh:

Dalam batas kuantitasi < 0,15 mg/L

Indeks minyak mineral 2,9 mg/L

CATATAN batas kuantitasi (LoQ) tergantung pada alat dan metode yang digunakan

3.27.4.9 Penentuan kisaran titik didih minyak mineral dari kromatogram gas

Tabel 11 memperlihatkan titik didih dari n-alkana yang mengandung atom karbon antara 2 dan 44 (sampai dengan C₄₄). Gunakan titik didih ini, ada kemungkinan untuk menentukan titik didih minyak mineral dengan membandingkan kalibrasi kromatogram gas campuran n-alkana dengan ekstrak contoh.

Tabel 11 – Titik didih dari n-alkana

| jumlah atom karbon | Titik didih | jumlah atom karbon | Titik didih |
|--------------------|-------------|--------------------|-------------|
| 2 | -89 | 23 | 380 |
| 3 | -42 | 24 | 391 |
| 4 | 0 | 25 | 402 |
| 5 | 36 | 26 | 412 |
| 6 | 69 | 27 | 422 |
| 7 | 98 | 28 | 432 |
| 8 | 126 | 29 | 441 |
| 9 | 151 | 30 | 450 |
| 10 | 174 | 31 | 459 |
| 11 | 196 | 32 | 468 |
| 12 | 216 | 33 | 476 |
| 13 | 235 | 34 | 483 |
| 14 | 253 | 35 | 491 |
| 15 | 271 | 36 | 498 |
| 16 | 287 | 37 | 505 |
| 17 | 302 | 38 | 512 |
| 18 | 317 | 39 | 518 |
| 19 | 331 | 40 | 525 |
| 20 | 344 | 41 | 531 |
| 21 | 356 | 42 | 537 |
| 22 | 369 | 43 | 543 |
| | | 44 | 548 |

3.27.5 PCB

3.27.5.1 Ekstraksi cair-cair (*Liquid- liquid extraction/LLE*) Metode II

3.27.5.1.1 Prinsip

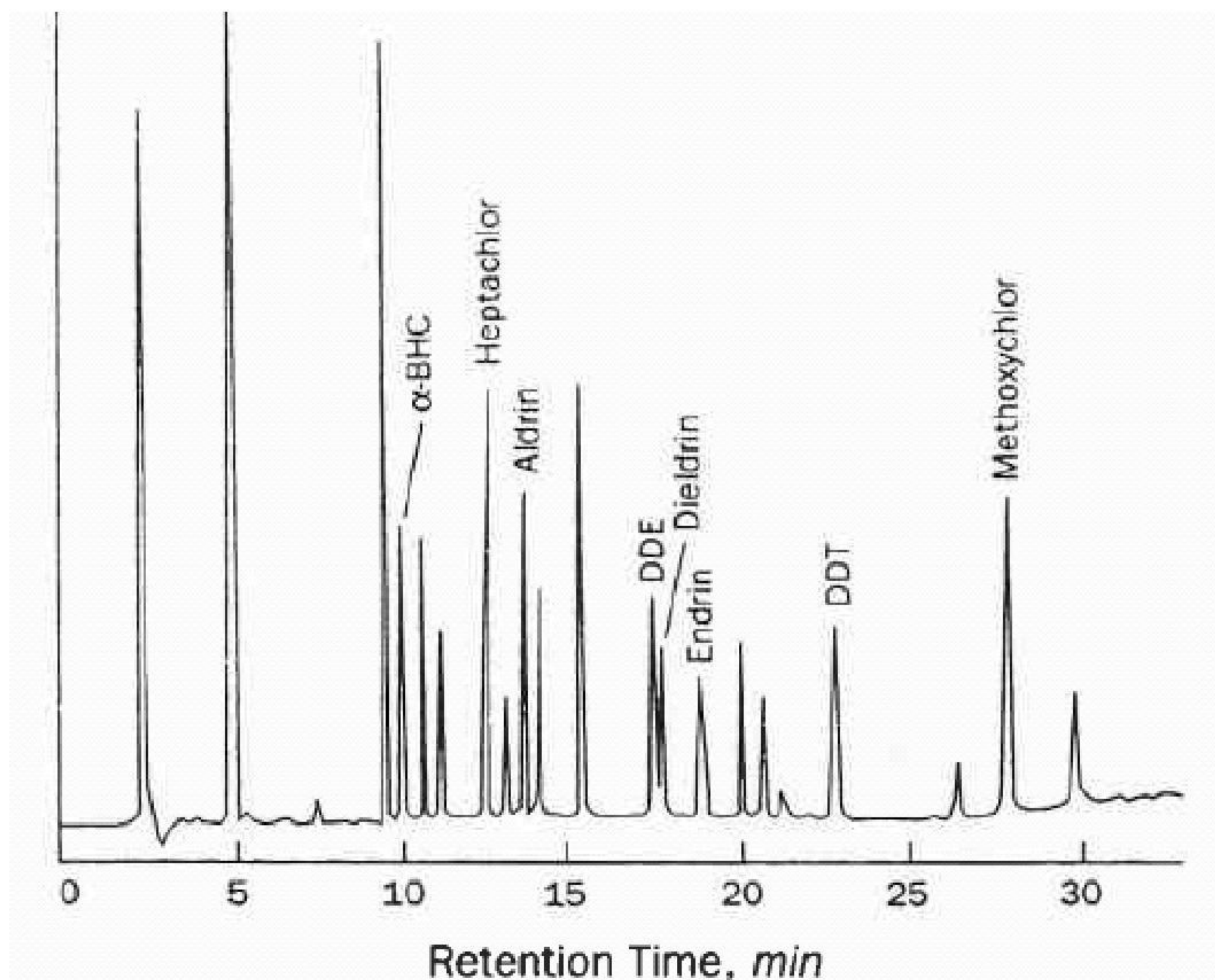
Contoh dengan volume terukur diekstraksi dengan diklorometana (*methylene chloride*) baik dengan ekstraksi cair-cair (*liquid- liquid extraction*) menggunakan corong pemisah atau dengan ekstraksi cair-cair kontinu (*continuous liquid- liquid extraction*). Ekstrak dikeringkan

dimana sebelumnya diekstraksi dengan heksana. Jika ada penetapan lain yang memiliki dasar ekstraksi dan langkah pemekatan yang sama, maka cukup dilakukan ekstraksi sampel tunggal saja. Ekstrak dipisahkan dan diukur dengan gas kromatografi menggunakan detektor penangkap elektron/*Electron Captured Detector* (ECD).

3.27.5.1.2 Peralatan

- a) Corong pemisah, 2 L, dengan tutup kran TFE;
- b) kolom pengering: kolom kromatografi, panjang 400 mm × 19 mm ID, dengan *coarse frit filter disk*;
- c) tabung pemekat (*concentrator tube*): Kuderna-Danish, 10 mL, terkalibrasi. Gunakan penutup gelas untuk mencegah penguapan;
- d) labu penguap (*evaporative flask*): Kuderna-Danish, 500 mL. sambungkan pada tabung pemekat dengan pegas atau per;
- e) Snyder column, Kuderna-Danish, three-ball macro;
- f) Snyder column, Kuderna-Danish, two-ball macro;
- g) Vial berwarna gelap (*amber glass*), dengan tutup TFE, 10 mL sampai 15 mL;
- h) Alat ekstraksi cair-cair kontinu, dilengkapi dengan TFE atau gelas penghubung dan keran tanpa pelumas.
- i) Batu didih berukuran sekitar 10/40 mesh. Panaskan sampai 400 °C selama 30 menit atau ekstrak dalam Soxhlet extractor dengan diklorometana;
- j) Penangas air, panaskan bersama tutupnya dengan toleransi suhu ± 2 °C;
- k) neraca analitik, terkalibrasi dengan ketelitian 0,000 1 g;
- l) Kolom kromatografik, panjang 400 mm × 22 mm ID dengan sumbat TFE dan dengan *coarse frit filter disk*;
- m) Kromatografi gas: sistem analitik lengkap dengan kromatografi gas yang sesuai untuk injeksi di kolom dan seluruh aksesoris yang diperlukan termasuk *syringe*, kolom analitik, gas dan *strip-chart-recorder*. Direkomendasikan menggunakan sistem data untuk mengukur luas puncak menggunakan:
 - 1) Kolom 1, panjang 1,8 m × 4 mm ID, kaca, berisi 1,5% SP-2250/1,95% SP-2401 pada *supelcoport* (100/120 mesh) atau yang setara. Kolom ini digunakan untuk meningkatkan sensitivitas dan presisi. Meskipun prosedur yang diuraikan di bawah ini mengacu terutama untuk kolom kemas (*packed column*), kolom kapiler dapat digunakan jika memberikan hasil yang setara
 - 2) Kolom 2, panjang 1,8 m × 4 mm ID, kaca, berisi 3% OV-1 pada *supelcoport* (100/120 mesh) atau yang setara.
 - 3) Detektor, penangkap elektron (ECD). Detektor ini digunakan untuk meningkatkan sensitivitas dan presisi.
- n) Spesifikasi kolom kromatografik untuk kolom yang dikemas dan kolom kapiler *fused silica*. Kolom dengan ID 4-mm paling sering digunakan. Aliran gas-pembawa adalah sekitar 60 mL/menit. Ketika digunakan kolom dengan ID 2-mm aliran gas-pembawa di kurangi menjadi sekitar 25 mL/menit. Pemisahan yang baik diperoleh dengan menggunakan 5 % OV-210 pada 100/120 mesh *dimethyl-dichlorosilane* yang digunakan dalam kolom *diatomaceous earth* 2-m. Kolom 1,5 % OV-17 dan 1,95 % QF-1 ini dianjurkan untuk konfirmasi analisis. Dua pilihan kolom tambahan termasuk: 3 % OV-1 dan fase-campuran 6 % QF-1 + 4 % SE-30, masing-masing pada *dimethyl-dichlorosilane* yang diperlakukan dalam kolom *diatomaceous earth*, 100/120 mesh. QV-210 yang merupakan bentuk halus dari QF-1, dapat menggantikan QF-1. Sebuah kolom cocok jika pengaruhnya cukup dan resolusi dapat diulang. Sebagai pilihan, gunakan kolom kapiler *fused silica* panjang 30 m dengan 0,32-mm ID atau 0,25-mm ID dan ketebalan lapisan 0,25 μ m, untuk analisis primer dan konfirmasi (lihat Gambar 13). *Co-elution* dari *Alpha-chlordane* dan *Endosulfan I* pada kolom konfirmasi yang disarankan membuatnya kurang diinginkan untuk analisis

primer. Detektor Jenis lain, seperti spektrometer massa, bisa juga digunakan untuk analisis konfirmasi. Gunakan aliran gas pembawa yang direkomendasikan oleh pabrik sesuai dengan Nomor identifikasi (ID) kolom, bersama dengan nitrogen membuat gas untuk operasi yang tepat dari detektor penangkap elektron.



Gambar 13 –Kromatogram dari campuran pestisida. Kolom DB-5, panjang 30 m, program suhu multilevel, detektor electron-capture

3.27.5.1.3 Pereaksi

- Air suling
 - larutan natrium hidroksida, NaOH, 10 N: larutkan 40 g NaOH dalam air untuk pereaksi dan encerkan menjadi 100 mL;
 - natrium sulfat, Na_2SO_4 , butiran (*granular*), anhidrat. Murnikan dengan memanaskan pada 400 °C selama 4 jam dalam cawan *porcelain*;
 - natrium tiosulfat, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ butiran (*granular*);
 - asam sulfat, H_2SO_4 , 1 + 1: perlahan-lahan tambahkan 50 mL H_2SO_4 pekat ke dalam 50 mL air untuk pereaksi;
 - aseton, heksana, isooktana, diklorometana, derajat pestisida atau yang setara;
 - etil eter, *nanograde* didestilasi ulang (*redistilled*) dalam gelas, jika perlu. Sebelum digunakan pastikan bahwa bebas dari peroksida dengan menggunakan kertas uji (*test strip*). Hilangkan peroksida dengan prosedur yang disediakan dengan kertas uji (*test strip*). Sesudah bersih, tambahkan 20 mL bahan pengawet etil alkohol per liter eter;
 - air raksa (*mercury*), disuling tiga kali;
 - serbuk tembaga yang diaktifkan;
 - larutan stok standar
- Siapkan bahan baku murni atau larutan standar bersertifikat. Siapkan secara tepat dengan berat sekitar 0,010 0 g bahan yang murni, larutkan dalam isooktan dengan derajat

pestisida atau pelarut lainnya yang sesuai, dan encerkan sampai tanda garis dalam labu ukur 10 mL; (1 μ L setara dengan 1,00 μ g senyawa diatas). Jika kemurnian senyawa yang diuji $\geq 96\%$, untuk menghitung konsentrasi stok standar tidak perlu faktor koreksi. Gunakan stok standar komersial yang bersertifikat.

- k) standar kalibrasi: Encerkan stok standar dengan isooktan dan gunakan nilai *method detection level* (MDL) dari Tabel 12.

Tabel 12 - Kondisi kromatografik dan *method detection level* (MDL)

| Senyawa | Waktu retensi (retention time) menit | | <i>method detection level</i> (MDL) μ g/L |
|--------------------|--|---------|--|
| | Kolom 1 | Kolom 2 | |
| Aldrin | 2,40 | 4,10 | 0,004 |
| Dieldrin | 5,45 | 7,23 | 0,002 |
| Heptachlor epoxide | 3,50 | 5,00 | 0,083 |
| PCB-1016 | mr | mr | nd |
| PCB-1221 | mr | mr | nd |
| PCB-1232 | mr | mr | nd |
| PCB-1242 | mr | mr | 0,065 |
| PCB-1248 | mr | mr | nd |
| PCB-1254 | mr | mr | nd |
| PCB-1260 | mr | mr | nd |

Syarat kolom 1: *Supelcoport* (100/120 mesh) dilapisi dengan 1,5 % SP-2250/1,95 % SP-2401 dikemas dalam *glass column* panjang 1,8 m \times 4 mm ID dengan 5 % *methane*/95 % argon *carrier gas* dengan *flow rate* 60 mL/menit. Suhu kolom *isothermal* pada 200 °C, kecuali untuk PCB-1016 sampai PCB-1248 pada 160 °C.

Syarat kolom 2: *Supelcoport* (100/120 mesh) dilapisi dengan 3 % OV-1 dikemas dalam *glass column* panjang 1,8 m \times 4 mm ID dengan 5 % *methane*/95 % argon *carrier gas* dengan *flow rate* 60 mL/menit. Suhu kolom *isothermal* pada 200 °C untuk pestisida; pada 140 °C untuk PCB-1221 dan 1232; dan pada 170 °C untuk PCB-1016 dan 1242 sampai 1268

Mr = *multiple peak response*, berbagai respon puncak

nd = *not determined* (tidak ditentukan)

- l) Pengawasan Mutu /*quality control* (QC) konsentrat contoh uji: siapkan kadar masing-masing senyawa contoh yang diuji dengan konsentrasi dalam aseton berikut ini: 4,4'-DDD, 10 μ g/mL; 4,4'-DDT, 10 μ g/mL; endosulfan II, 10 μ g/mL; endosulfan sulfat, 10 μ g/mL; endrin 10 μ g/mL; pestisida komponen tunggal lainnya, 2 μ g/mL. Jika metode ini hanya digunakan untuk menganalisis PCBs, *chlordane* atau *toxaphene*, *quality control* (QC) konsentrat contoh yang diuji/diperiksa harus mengandung senyawa multikomponen yang paling mewakili pada konsentrasi 50 μ g/mL dalam aseton. Jika contoh tersebut tidak tersedia, siapkan menggunakan standar stok yang dapat diambil secara bebas dari yang digunakan untuk standar kalibrasi.

3.27.5.1.4 Cara Kerja

- a) Ekstraksi: Tandai meniskus air disisi botol contoh untuk menentukan volume akhir. Tuangkan seluruh contoh ke dalam corong pemisah 2 L atau 1 L atau 2 L alat ekstraksi cair-cair kontinu (*continuous liquid- liquid extractor*) selama jangka waktu 18 jam. Ekstraksi dengan diklorometan tanpa penyesuaian pH atau pencucian pelarut dengan cara sebagai berikut:

- 1) Ekstraksi: pada umumnya ekstraksi dilakukan dengan menggunakan corong pemisah, tetapi jika terjadi emulsi gunakan ekstraksi kontinu (*continuous extraction*). Untuk contoh basa/netral dengan volume contoh 2 L, lakukan ekstraksi berseri dengan volume diklorometana 250 dan 100 mL, dan untuk contoh asam lakukan ekstraksi berseri dengan volume diklorometana 200 dan 100 mL. Tandai meniskus air disisi botol contoh untuk menentukan volume akhir. Tuangkan seluruh contoh ke dalam labu pemisah 2 L. Pipet 1,00 mL larutan standar pengganti kedalam corong pemisah dan campur dengan baik. Periksa pH dengan kertas pH kisaran lebar dan atur pH > 11 dengan larutan NaOH.

Tambahkan 60 mL *diklorometana* ke dalam botol contoh, tutup dan kocok selama 30 detik untuk membasahi permukaan bagian dalam. Pindahkan pelarut ke dalam corong pemisah dan ekstraksi contoh dengan dengan cara mengocok selama 2 menit dengan membuka tutup secara berkala untuk melepaskan tekanan berlebih. Biarkan lapisan organik memisah dari fase air minimal selama 10 menit. Jika emulsi diantara pertemuan lapisan lebih dari sepertiga volume lapisan pelarut, gunakan teknik menggunakan mesin untuk menyelesaikan pemisahan fasa. Teknik yang optimum tergantung pada contoh, tetapi meliputi pengadukan, penyaringan emulsi melalui benang halus dari kaca (*glass wool*), sentrifugasi atau metode fisika lainnya. Kumpulkan ekstrak *diklorometana* dalam Erlenmeyer 250 mL.

Jika emulsi tidak bisa dipecah (perolehan kembali *diklorometana* yang kurang dari 80%, dikoreksi terhadap kelarutan dalam air *diklorometana*) dalam ekstraksi pertama, pindahkan contoh, pelarut dan emulsi ke dalam ruang ekstraksi dari ekstraktor kontinu dan diproses seperti yang dijelaskan di 3.27.5.1.4.a.2 di bawah ini.

Tambahkan volume 60 mL kedua *diklorometana* kedalam botol contoh dan ulangi prosedur ekstraksi di atas, gabungkan hasil ekstraksi dalam labu Erlenmeyer. Lakukan ekstraksi ketiga dengan cara yang sama.

Setelah ekstraksi ketiga, atur pH fasa air menjadi < 2 menggunakan H_2SO_4 , kemudian diekstraksi tiga kali berturut-turut dengan 60 mL *diklorometana*. Kumpulkan dan gabungkan hasil ekstraksi dalam 250 mL *Erlenmeyer* dan gabungan hasil ekstraksi tersebut dinyatakan sebagai fraksi asam.

Untuk masing-masing fraksi, pasang *Kuderna-Danish concentrator* (K-D) dengan menghubungkan tabung konsentrator 10 mL terhadap 500 mL labu penguapan. peralatan pemekat atau teknik yang lain dapat digunakan jika persyaratan 3.27.5.1.6 (Pengawasan mutu /pengendalian mutu/ QC dipenuhi).

Tuangkan gabungan hasil ekstraksi melalui kolom pengering, yang berisi paling tidak 10 cm anhidrat Na_2SO_4 atau lebih dan kumpulkan hasil dalam konsentrator. Bilas labu Erlenmeyer dan kolom dengan 20 mL sampai 30 mL *diklorometana* untuk menyelesaikan pemindahan hasil ekstraksi.

Tambahkan satu atau dua batu didih yang bersih kedalam labu penguap dan pasang kolom *three-ball Snyder*. Sebelumnya basahi kolom *Snyder* dengan ± 1 mL *diklorometana* ke bagian atas. Tempatkan peralatan K-D di atas penangas air (60 °C sampai 65 °C) sehingga tabung pemekat sebagian terendam dalam air. Atur posisi peralatan tegak lurus dan suhu air yang diperlukan untuk memekatkan dalam waktu 15 sampai 20 menit. Pada laju penyulingan yang tepat, bola kolom bergerak secara aktif tetapi ruangan tidak dibanjiri pelarut yang kental. Ketika volume cairan terlihat mencapai 1 mL, lepaskan peralatan K-D dan biarkan mengalir dan dingin selama paling sedikit 10 menit.

Lepaskan kolom *Snyder*, labu dan bagian bawahnya dibilas dengan 1 mL sampai 2 mL diklorometana ke dalam tabung pemekatan, sebaiknya gunakan *syringe* 5 mL.

Tambahkan satu atau dua butir batu didih bersih ke dalam tabung pemekatan untuk masing-masing fraksi dan pasang kolom *two-ball micro-Snyder*. Sebelumnya basahi kolom *Snyder* dengan *menambahkan* sekitar 0,5 mL diklorometana ke bagian atas. Tempatkan peralatan K-D di atas penangas air (60 °C sampai 65 °C) sehingga tabung pemekat/konsentrator sebagian terendam dalam air panas dan lanjutkan pemekatan sesuai petunjuk di atas tanpa penambahan pelarut lanjutkan sampai volume cairan terlihat mencapai sekitar 0,5 mL. Setelah pendinginan, lepaskan kolom *Snyder*, labu dan bagian bawahnya bilas dengan sekitar 0,2 mL diklorometana. Atur volume akhir menjadi 1,0 mL dengan pelarut. Tutup tabung pemekatan dan simpan dalam lemari es jika proses lebih lanjut tidak akan segera dilakukan. Jika hasil ekstraksi akan disimpan lebih lama dari 2 hari, pindahkan ke botol bertutup ulir *TFE* yang tertutup rapat, beri label basa/ fraksi netral atau asam yang sesuai.

Tentukan volume contoh awal dengan mengisi ulang botol contoh yang telah ditandai dan pindahkan cairan ke 1 000 mL gelas ukur. Catat volume contoh ke 5 mL terdekat.

2) Ekstraksi kontinu (*continuous extraction*)

Tandai meniskus air di sisi botol contoh, dan kemudian tentukan volume contoh seperti yang dijelaskan dalam 3.27.5.1.4.1. Periksa pH dengan kertas pH dan atur pH >11 dengan larutan NaOH. Pindahkan contoh ke dalam alat ekstraksi kontinu dan tambah 1,00 mL larutan standar pengganti dengan menggunakan pipet dan aduk dengan baik. Tambahkan 60 mL diklorometana ke dalam botol contoh, tutup dan kocok selama 30 detik, untuk membilas permukaan bagian dalam. Pindahkan pelarut ke dalam alat ekstraksi, ulangi pembilasan dengan menambahkan 50 mL sampai 100 mL *diklorometana* dan tambahkan hasil bilasan ke dalam alat ekstraksi

Tambah 200 mL sampai 500 mL diklorometana ke dalam labu penyulingan, tambahkan air untuk menjamin reaksi yang cukup, dan ekstraksi selama 24 jam. Biarkan dingin dan lepaskan labu penyulingan. Keringkan, pekatkan dan tutup hasil ekstraksi seperti sub pasal 3.27.5.1.4.1 di atas.

Isi labu penyulingan yang bersih dengan 500 mL diklorometana dan pasang labu ke alat ekstraksi kontinu. Aduk secara hati-hati, sesuaikan pH fase air menjadi kurang dari pH 2 dengan penambahan H_2SO_4 . Ekstraksi selama 24 jam, keringkan, pekatkan dan tutup hasil ekstraksi seperti sub pasal 3.27.5.1.4.1 di atas.

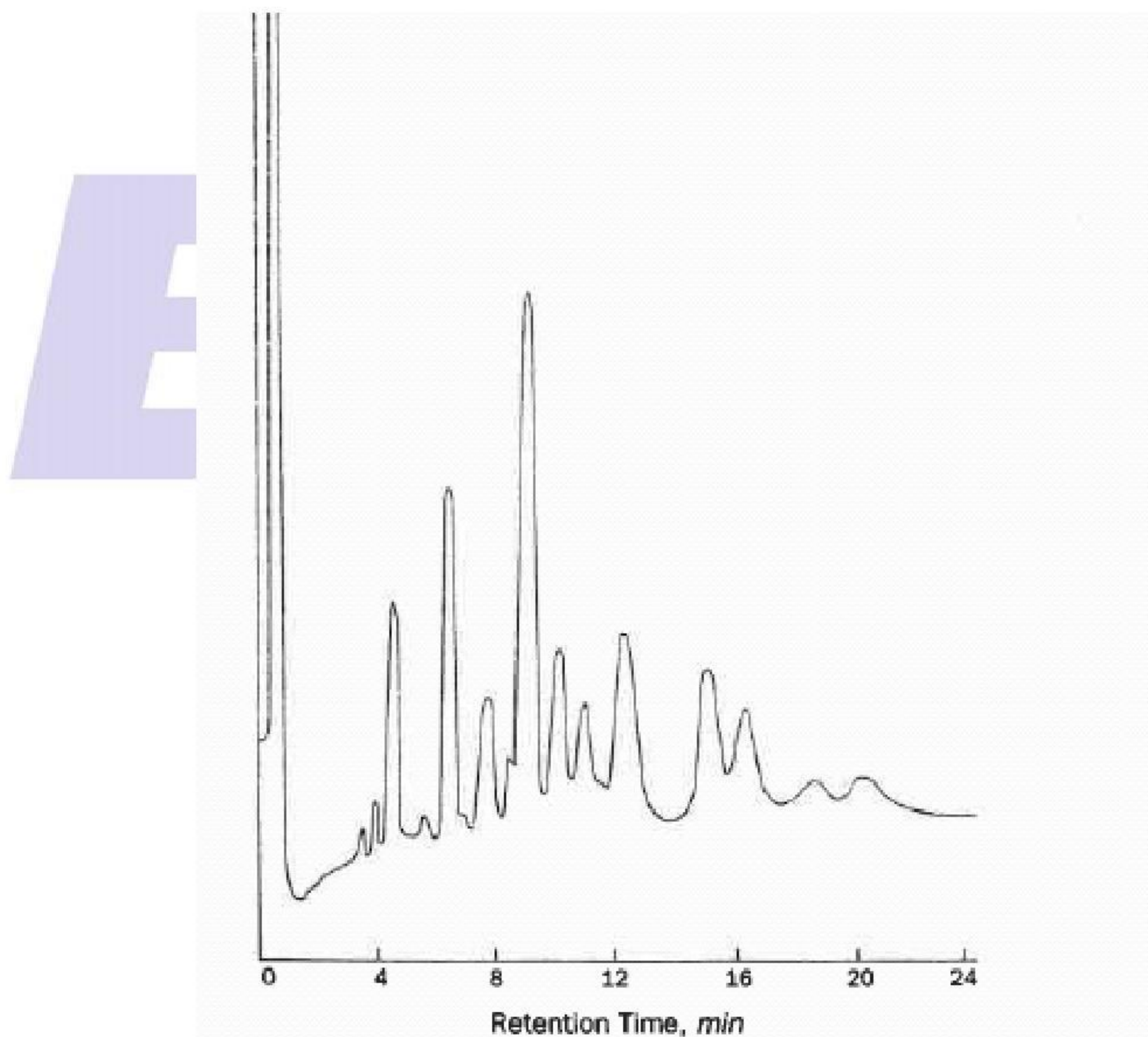
- b) Sesudah ekstraksi dan pemekatan dengan kolom *three-ball Snyder*, naikan suhu air pada penangas air menjadi sekitar 80 °C. Keluarkan sebentar kolom *Snyder*, tambahkan 50 mL heksana dan batu didih baru (*new boiling chip*), dan pasang kembali kolom *Snyder*. Pekatkan ekstrak seperti yang dilakukan sebelumnya tetapi gunakan heksana untuk pembasahan awal (*prewet*) kolom. Selesaikan pemekatan dalam 5-10 menit.
- c) Lepaskan kolom *Snyder* dan bilas labu dengan 1-2 mL heksana dan hasil pemekatan ini digabungkan ke dalam tabung pemekatan. Sebaiknya gunakan *syringe* 5 mL untuk kegiatan ini. Tutup tabung pemekatan dan simpan dalam lemari es jika pemrosesan lebih lanjut tidak dapat dilakukan segera. Jika ekstrak akan disimpan lebih dari 2 hari, pindahkan ke vial bertutup ulir *TFE*. Jika ekstrak tidak memerlukan pencucian lebih lanjut, lanjutkan dengan analisis gas kromatografi.
- d) Tentukan volume contoh awal dengan mengisi ulang botol contoh yang telah ditandai dan pindahkan cairan ke gelas ukur 1 000 mL. Catat volume contoh ke 5 mL yang terdekat.
- e) kondisi pengoperasian kromatografi gas: Tabel 10 merangkum kondisi pengoperasian yang disarankan untuk kromatografi gas, waktu retensi (*retention time*) dan *method*

detection level (MDL) yang dapat dicapai pada kondisi ini. Pemisahan contoh yang diperoleh dengan kolom 1 diperlihatkan dalam Gambar 14 sampai Gambar 20. Kolom kemas atau kolom kapiler, kondisi kromatografik, atau detektor yang lain dapat digunakan jika persyaratan 3.27.5.1.6 terpenuhi.

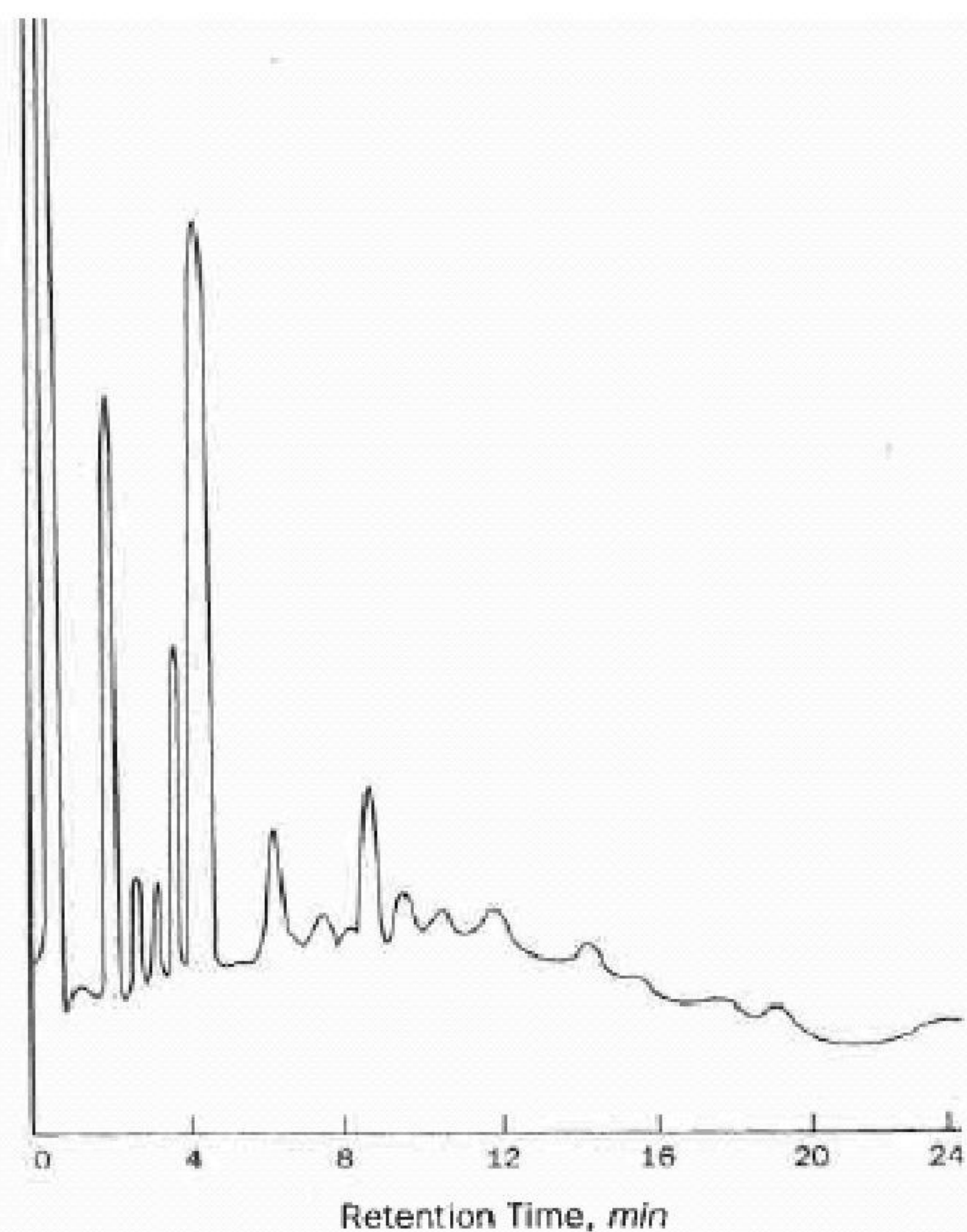
- f) Kalibrasi: kalibrasikan sistem secara berkala, baik dengan prosedur eksternal atau internal.

CATATAN untuk kuantifikasi dan identifikasi dari campuran seperti PCB, *chlordan*, dan *toxaphane*, diberikan perhatian secara ekstra.

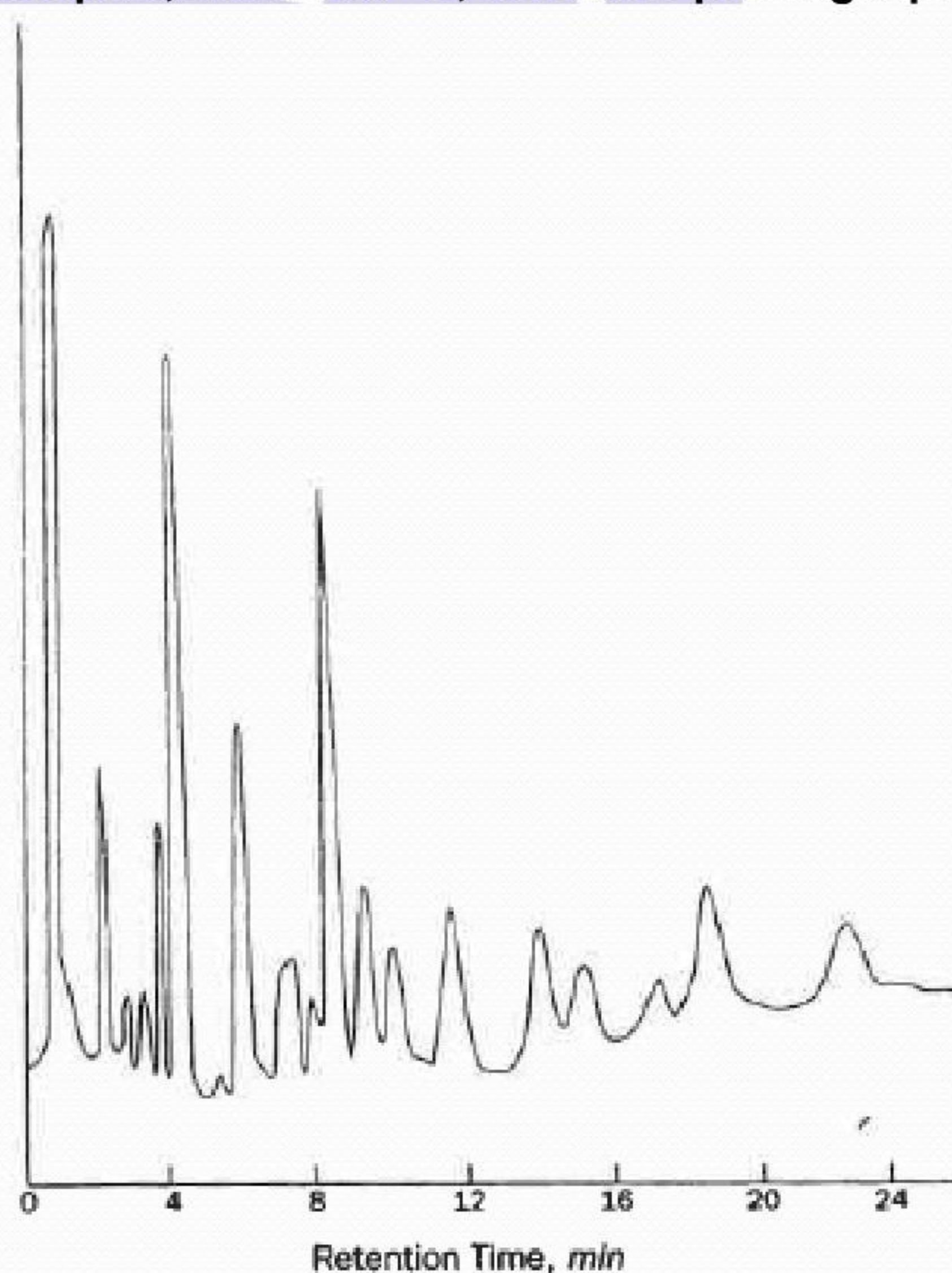
- 1) Cara kerja kalibrasi standar eksternal — buat standar seperti tercantum dalam 3.27.5.1.3.L. Susun data menjadi tabel dan dapatkan kurva kalibrasi atau faktor kalibrasi seperti tercantum dalam pasal 3.27.5.1.3.c.3.
- 2) Cara kerja kalibrasi standar internal — buat standar seperti tercantum dalam 3.27.5.1.3.L. Susun data menjadi tabel dan hitung *response factor* (RF) seperti tercantum dalam pasal 3.27.5.1.3.c.2. Verifikasi kurva kalibrasi kerja, faktor kalibrasi, atau RF pada setiap pergantian kerja (*working shift*) dengan mengukur satu atau lebih standar kalibrasi. Jika respon untuk setiap senyawa bervariasi lebih dari $\pm 15\%$, ulangi pengujian menggunakan standar kalibrasi yang baru. Cara lainnya, buat kurva kalibrasi baru untuk senyawa tersebut.



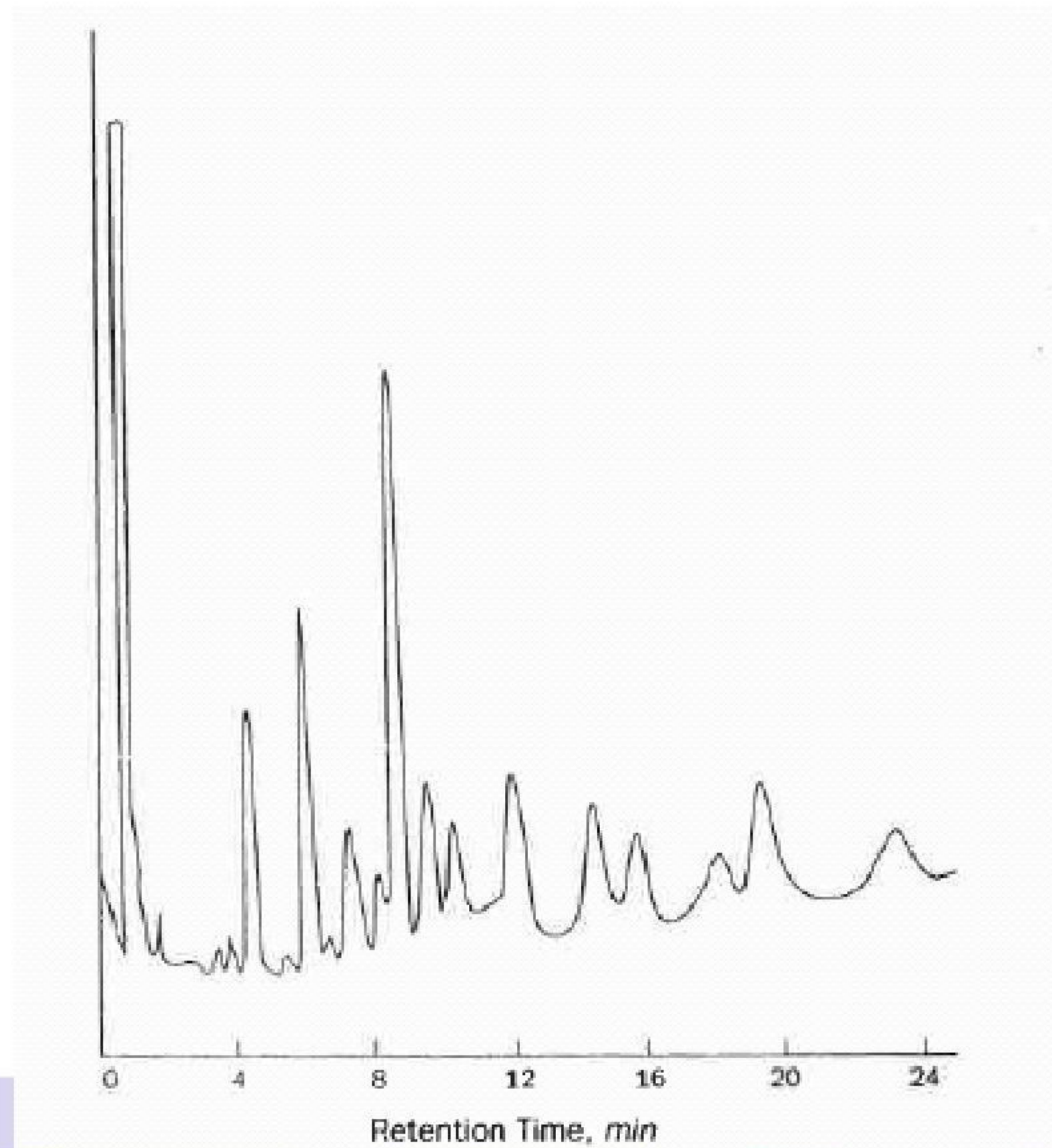
Gambar 14 – Kromatogram gas dari PCB-1016. Kolom 1,5% SP-2250/1,95%SP-2401 pada *Supelcoport*; suhu 160 °C; detektor: penangkap elektron



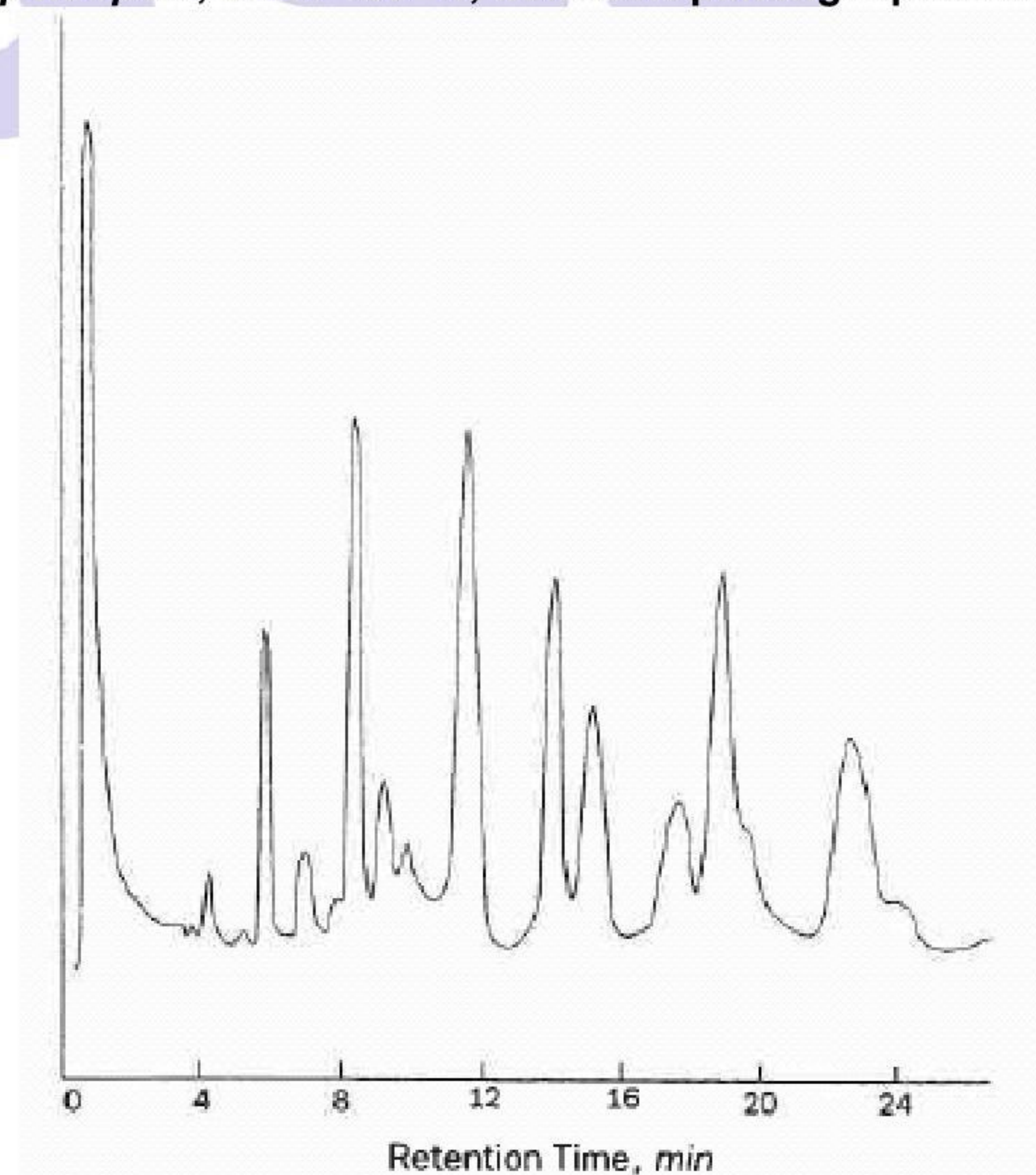
Gambar 15 – Kromatogram gas dari PCB-1221. Kolom 1,5% SP-2250/1,95% SP-2401 pada Supelcoport; suhu 160 °C; detektor: penangkap elektron



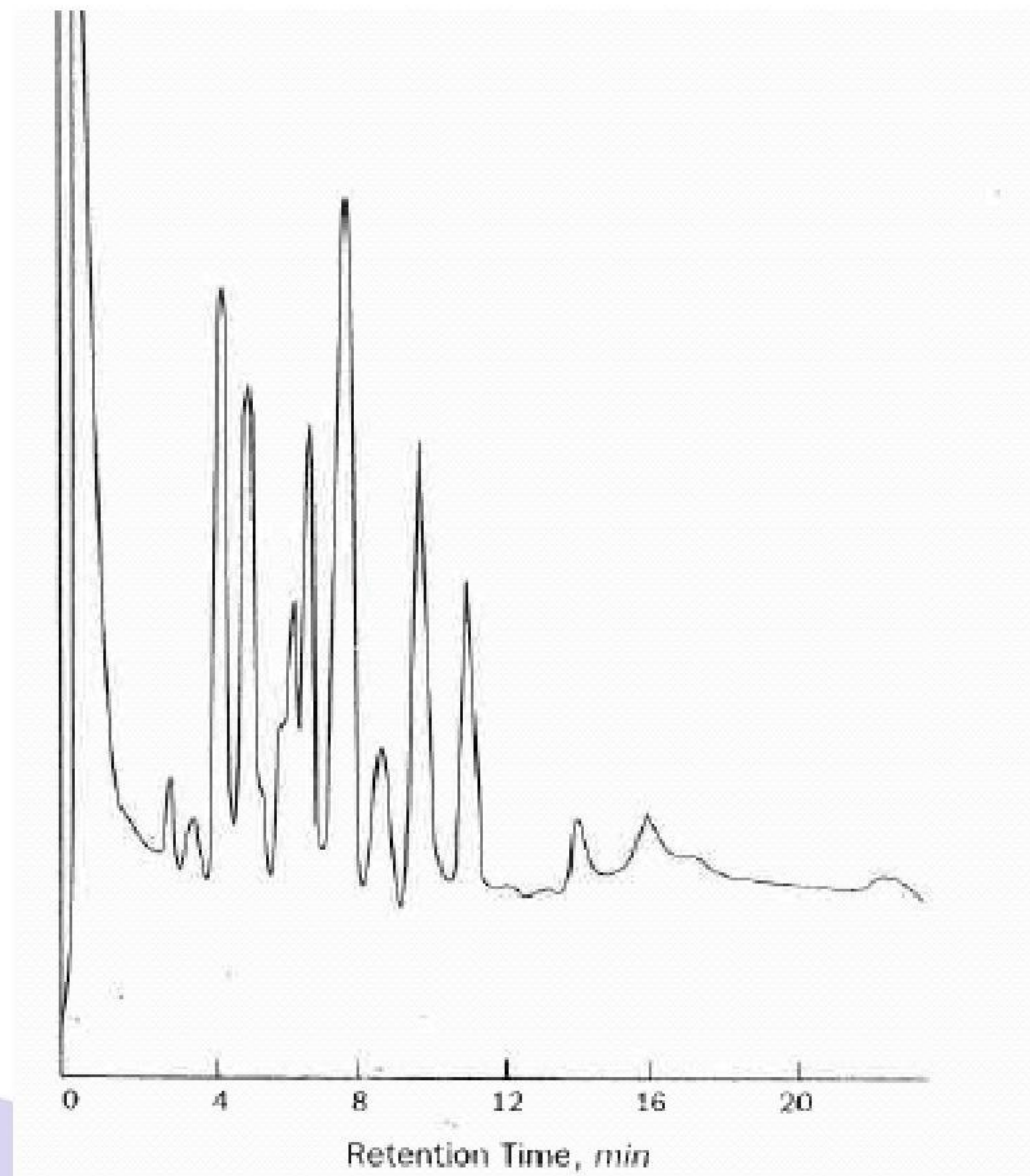
Gambar 16 - Kromatogram gas dari PCB-1232. Kolom 1,5% SP-2250/1,95% SP-2401 pada Supelcoport; suhu 160 °C; detektor: penangkap elektron



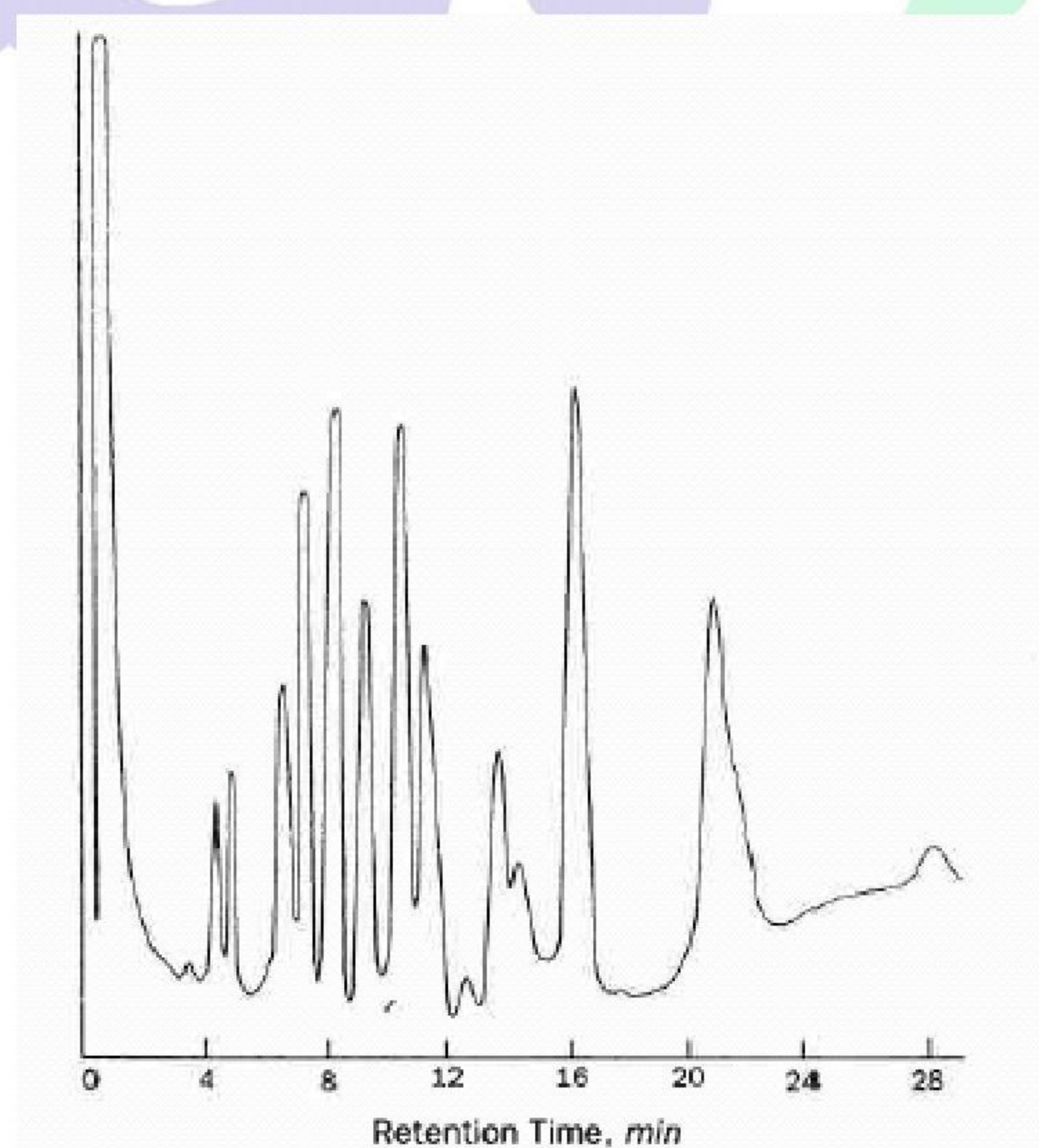
Gambar 17 – Kromatogram gas dari PCB-1242. Kolom 1,5% SP-2250/1,95% SP-2401 pada Supelcoport; suhu 160 °C; detektor: penangkap elektron



Gambar 18 – Kromatogram gas dari PCB-1248. Kolom 1,5% SP-2250/1,95% SP-2401 pada Supelcoport; suhu 160 °C; detector: penangkap elektron



Gambar 19 – Kromatogram gas dari PCB-1254. Kolom 1,5% SP-2250/1,95% SP-2401 pada Supelcoport; suhu 200 °C; detektor: penangkap elektron



Gambar 20 – Kromatogram gas dari PCB-1260. Kolom 1,5% SP-2250/1,95% SP-2401 pada Supelcoport; suhu 200 °C; detektor: penangkap elektron

g) Analisis contoh: Lakukan sub pasal 3.27.5.1.4 (cara Kerja).

3.27.5.1.5 Perhitungan

- Tentukan konsentrasi senyawa individu
- Jika terlihat dua atau lebih campuran PCB (*Aroclor*), cara kerja *Webb* dan *McCall* dapat digunakan untuk identifikasi dan menghitung *Aroclors*, tergantung pada *Aroclors* yang muncul.
- Untuk campuran multi komponen (*chlordane*, *toxaphene* dan PCB) cocokan waktu retensi (*retention times*) puncak standar dengan puncak contoh. Kuantitasi setiap puncak yang dapat diidentifikasi sesuai tinggi puncak atau area dari masing-masing komponen teridentifikasi dalam kromatogram. Hitung sebagai respon total contoh terhadap respon total standar. Degradasi senyawa ini dapat menyulitkan dalam identifikasi. Metode ini sesuai hanya untuk campuran yang masih utuh seperti formula/rumusan *Aroclor* atau pestisida yang asli dan metode ini tidak sesuai untuk campuran lain yang tidak stabil. Dalam kondisi ini pola puncak pada kromatografi gas tidak akan cocok dengan standar.
- Laporkan hasil dalam mikrogram per liter tanpa koreksi untuk data perolehan kembali (*recovery*). Laporkan data pengawasan mutu (QC) dengan hasil contoh.

3.27.5.1.6 Pengawasan mutu (QC)

- Pengawasan mutu awal: untuk mendapatkan data dengan presisi dan penyimpangan yang dapat diterima, lanjutkan sebagai berikut: Gunakan pipet, buat contoh QC (pengawasan mutu) dengan konsentrasi pengujian yang ditunjukkan dalam Tabel 13 dengan menambahkan 1,00 mL dari konsentrat contoh, cek QC (lihat sub pasal 3.27.5.1.3.I) masing-masing ke dalam empat bagian 1 L air suling. Analisis contoh QC sesuai sub pasal 3.27.5.1.4 (Cara Kerja). Hitung rata-rata perolehan kembali (*recovery*) dan standar deviasi dari perolehan kembali (*recovery*), bandingkan dengan kriteria keberterimaan
- Analisis contoh dengan penambahan yang diketahui: Buat konsentrat contoh QC menurut (lihat sub pasal 3.27.5.1.3.L dan gunakan Tabel 11 dan Tabel 12.
- Analisis standar QC (pengawasan mutu): Buat standar QC menurut (lihat sub pasal 3.27.5.1.3.L dan gunakan Tabel 13. Jika seluruh senyawa dalam Tabel 13 dalam contoh diukur menurut sub pasal 3.27.5.1.6.b di atas, kemungkinan akan diperlukan analisis QC; Oleh karena itu, lakukan analisis standar QC dengan contoh yang diketahui penambahannya secara rutin.

Tabel 13 – QC Kriteria keberterimaan*

| Senyawa | konsentrasi yang uji | Batas untuk s | kisaran untuk \bar{x} | Kisaran untuk \bar{P} , Ps |
|--------------------|----------------------|---------------|-------------------------|------------------------------|
| | µg/L | µg/L | µg/L | % |
| Aldrin | 2,0 | 0,42 | 1,08 – 2,24 | 42 – 122 |
| Dieldrin | 2,0 | 0,76 | 1,15 – 2,49 | 36 – 146 |
| Heptachlor epoxide | 2,0 | 0,41 | 1,13 – 2,63 | 37 – 142 |
| PCB-1016 | 50 | 10,0 | 30,5 – 51,5 | 50 – 114 |
| PCB-1221 | 50 | 24,4 | 22,2 – 75,2 | 15 – 178 |
| PCB-1232 | 50 | 17,9 | 14,0 – 98,5 | 10 – 215 |
| PCB-1242 | 50 | 12,2 | 24,8 – 69,6 | 39 – 150 |
| PCB-1248 | 50 | 15,9 | 29,0 – 70,2 | 38 – 158 |
| PCB-1254 | 50 | 13,8 | 22,2 – 57,9 | 29 – 131 |
| PCB-1260 | 50 | 10,4 | 18,7 – 54,9 | 8 – 127 |

*s = standar deviasi dari pengukuran empat perolehan kembali (*recovery*)

\bar{x} = rata-rata perolehan kembali (*recovery*) untuk pengukuran empat perolehan kembali (*recovery*)

\bar{P} , P = pengukuran persen perolehan kembali (*recovery*)

D = Hasil terdeteksi harus lebih besar dari nol

Catatan : Kriteria-kriteria ini didasarkan atas data kinerja metode pada Tabel 14. Jika diperlukan, batas perolehan kembali diperbesar untuk menjamin penerapan konsentrasi batas bawah yang digunakan untuk pengembangan Tabel 14.

Tabel 14 – Presisi metode dan bias sebagai fungsi konsentrasi

| Senyawa | Bias, as Recovery, X' $\mu\text{g/L}$ | Single-Analyst Precision, sr $\mu\text{g/L}$ | Overall Precision, S' $\mu\text{g/L}$ |
|----------|--|---|--|
| PCB-1016 | $0,81C + 0.50$ | $0,13 \bar{x} + 0,15 -$ | $0,15 \bar{x} + 0,45$ |
| PCB-1221 | $0,96C + 0.65$ | $0,29 \bar{x} - 0,76$ | $0,35 \bar{x} - 0,62$ |
| PCB-1232 | $0,91C + 10.79$ | $0,21 \bar{x} - 1,93$ | $0,31 \bar{x} + 3,50$ |
| PCB-1242 | $0,93C + 0.70$ | $0,11 \bar{x} + 1,40$ | $0,21 \bar{x} + 1.52$ |
| PCB-1248 | $0,97C + 1.06$ | $0,17 \bar{x} + 0,41$ | $0,25 \bar{x} - 0.37$ |
| PCB-1254 | $0,76C + 2.07$ | $0,15 \bar{x} + 1,66$ | $0,17 \bar{x} + 3.62$ |
| PCB-1260 | $0,66C + 3.76$ | $0,22 \bar{x} - 2,37$ | $0,37 \bar{x} - 4.86$ |

3.28 Cemarkan mikroba

3.28.1 Angka lempeng total

3.28.1.1 Definisi

Mikroorganisme yang dapat dibiakkan (*culturable microorganisms*)

semua bakteri aerob, kapang dan khamir yang dapat membentuk koloni pada media biakan tertentu pada kondisi pengujian yang sesuai.

3.28.1.2 Prinsip

Menginkubasikan contoh atau hasil pengenceran contoh dengan volume terukur pada cawan Petri dan mencampurkannya dengan media tertentu. Menginkubasi satu set cawan pada suhu $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama $44\text{ jam} \pm 4\text{ jam}$, dan set lainnya pada $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama $68\text{ jam} \pm 4\text{ jam}$.

Menghitung jumlah koloni per mililiter (mL) contoh dari jumlah koloni yang terbentuk pada media.

3.28.1.3 Peralatan

Gunakan peralatan yang umum digunakan untuk laboratorium mikrobiologi, dan khususnya :

- 3.28.1.3.1 Alat untuk sterilisasi dengan uap air (autoklaf)
- 3.28.1.3.2 Inkubator yang dapat mempertahankan suhu $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 3.28.1.3.3 Inkubator yang dapat mempertahankan suhu $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 3.28.1.3.4 Cawan Petri dari gelas atau plastik dengan diameter 90 mm atau 100 mm
- 3.28.1.3.5 Penangas air atau alat serupa yang dapat mempertahankan suhu $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 3.28.1.3.6 Alat penghitung koloni dengan metode iluminasi terhadap dasar gelap.

3.28.1.4 Pengambilan contoh

Ambil contoh air sesuai petunjuk pengambilan contoh dan kirim contoh ke laboratorium penguji. Volume contoh air yang diperlukan dalam analisa air minum dalam kemasan adalah 250 mL. Usahakan agar waktu antara pengambilan contoh dan pengujian sesingkat mungkin. Untuk air minum, pengujian sebaiknya dilakukan pada hari yang sama dengan pengambilan contoh. Disarankan untuk melakukan pengujian dalam waktu 8 jam setelah pengambilan contoh.

Untuk contoh yang ditransportasikan lebih dari 8 jam, perlu dimonitor dan dicatat suhunya. Kondisi transportasi harus didokumentasikan. Hal ini karena terkait dengan penundaan waktu pengujian.

Hal hal yang termasuk dalam penundaan waktu pengujian setelah pengambilan contoh adalah transportasi, registrasi dan pengelolaan contoh di laboratorium.

Penundaan waktu antara sampling dan pengujian contoh dapat menurunkan reliabilitas hasil uji. Oleh karena itu, pengambil contoh dan analis harus bekerjasama untuk menetapkan jumlah contoh yang dapat diuji setelah pengambilan contoh. Penundaan waktu harus sesingkat mungkin dan cantumkan dalam laporan hasil uji.

Periksa air yang dikirim dalam wadah tertutup, termasuk air mineral alami, dalam 12 jam setelah pembotolan, jaga suhu penyimpanan pada $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ selama periode tersebut.

3.28.1.5 Media pembiakan dan pengencer

3.28.1.5.1 Bahan dasar

Untuk persiapan media, gunakan bahan-bahan dengan kualitas seragam dan bahan kimia dengan kualitas analitik; sebagai alternatif gunakan media lengkap dehidrat yang setara dan ikuti instruksi dari pabrikan.

Untuk pembuatan media, gunakan air suling atau air terdeionisasi sesuai ISO 3696 *grade 3* (lihat Tabel 15) dan bebas dari bahan-bahan yang mungkin menghambat pertumbuhan pada kondisi pengujian.

CATATAN penggunaan bahan kimia dari *grade* lainnya diperbolehkan apabila terbukti memberikan hasil yang setara dalam pengujian.

Tabel 15 - Persyaratan air *grade 3*

| Parameter | Spesifikasi <i>grade 3</i> |
|---|----------------------------|
| Nilai pH pada suhu 25 °C (<i>inclusive range</i>) | 5.0 – 7.5 |
| Konduktivitas listrik maksimum (mS/m pada suhu 25 °C) | 0.5 |
| Kandungan maksimum unsur oksigen <i>oxydizable</i> (mg/L) | 0.4 |
| Absorbansi maksimum pada panjang gelombang 254 nm dan panjang jarang optik 1 cm (unit absorbansi) | Tidak spesifik |
| Residu maksimum setelah penguapan pada pemanasan 110 °C (mg/kg) | 2 |
| Kandungan Silika (SiO ₂) maksimum (mg/L) | Tidak spesifik |

sumber : ISO 3696

3.28.1.5.2 Pengencer

Untuk pengenceran, gunakan pengencer pepton sesuai ISO 8199 seperti berikut :

Pengencer pepton (ISO 8199)

Kasein yang dihidrolisa secara enzimatis (pepton) 1,0 g

Air (*Grade 3*) 1 000 mL

Larutkan bahan-bahan dalam air, panaskan jika diperlukan. Sesuaikan pH dengan menambahkan larutan sodium hidroksida [$c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/L}$] atau asam klorida [$c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/L}$] sehingga setelah sterilisasi dalam autoklaf pada $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ selama (15 ± 1) menit. pH akan menjadi $7,0 \pm 0,5$ pada 25°C .

3.28.1.5.3 Yeast extract agar

Trypton (Pepton dari Kasein, pankreatik) 6,0 g

Yeast extract dehidrat 3,0 g

Agar, bubuk atau serpihan 10 g sampai 20 g (tergantung kekuatan gel)

Air 1 000 mL

Tambahkan bahan-bahan, atau media lengkap dehidrat, ke dalam air dan larutkan dengan pemanasan. Sesuaikan pH apabila diperlukan sehingga setelah sterilisasi menjadi $7,2 \pm 0,2$ pada 25°C

Tuang sebanyak 15 mL sampai 20 mL ke tabung, botol atau wadah lainnya. Untuk penyimpanan dalam wadah yang lebih besar, gunakan wadah dengan kapasitas sampai 500 mL. Sterilisasi dalam autoklaf pada $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ selama (15 ± 1) menit.

Untuk penggunaan, cairkan media pembiakan, biarkan dingin dan jaga suhunya pada $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ menggunakan penangas air (3.28.1.3.5). Dianjurkan untuk menyimpan media pembiakan ini tidak lebih dari 4 jam pada 45°C , apabila melebihi maka harus dibuang.

3.28.1.6 Prosedur**3.28.1.6.1 Persiapan dan Inokulasi**

Gunakan metode cawan tuang (3.28.1.6.1.1). Tempatkan sejumlah contoh uji (atau hasil pengencerannya) tidak melebihi 2 mL di cawan Petri, tambahkan 15 mL sampai dengan 20 mL media cair steril (3.28.1.5.3) dan campur hati-hati dengan memutar pelan-pelan; biarkan media untuk membeku. Waktu antara penambahan bahan yang diuji (atau pengencerannya) dan penambahan media cair tidak boleh melebihi 15 menit. Inokulasi paling tidak satu cawan untuk inkubasi di masing-masing suhu.

3.28.1.6.1.1 Teknik cawan tuang (ISO 8199)**3.28.1.6.1.1.1 Persiapan contoh**

Sebelum pengujian, campur contoh dengan baik dengan pengocokan yang kuat untuk memperoleh distribusi mikroorganisme yang merata. Tergantung pada contoh air dan kandungan mikroorganisme yang diperkirakan, buat pengenceran yang diperlukan.

Pada metode hitungan cawan umumnya digunakan pengenceran secara desimal.

Untuk pengenceran desimal (satu per sepuluh kali), ukur 90 mL atau 9 mL pengencer dan masukkan pada botol atau tabung pengencer steril. Sebagai alternatif, dapat digunakan pengencer dengan volume tersebut yang telah disterilisasi terlebih dahulu pada botol bertutup ulir. Satu atau lebih pengenceran desimal dilakukan dengan cara memindahkan satu volume contoh air ke dalam sembilan volume pengencer. Campur larutan sepenuhnya (dengan pipet baru atau secara mekanis) dan pindahkan satu volume dari pengenceran ini

pada sembilan volume pengenceran berikutnya. Tahap ini diulang sesuai dengan yang diperlukan. Siapkan volume yang cukup untuk setiap pengenceran sesuai dengan yang diperlukan untuk semua pengujian terhadap contoh.

Untuk pengenceran tidak secara desimal, volume pengencer harus disesuaikan dengan volume contoh. Beberapa pendekatan dapat dilakukan, misalnya seri pengenceran 3 atau 4 kali, atau seri pengenceran desimal dimana dilakukan penyaringan dengan volume 10 mL dan 30 mL. Pengenceran empat kali dapat dilakukan sebagaimana yang dilakukan untuk pengenceran desimal, tetapi dalam hal ini satu volume contoh air dicampur dengan tiga volume pengencer.

Jika konsentrasi target mikroorganisme diperkirakan tinggi, tahap pengenceran seratus kali (satu per seratus) dapat digunakan.

3.28.1.6.1.1.2 Porsi uji

Volume porsi uji (bagian yang diuji) dari contoh atau hasil pengenceran contoh, dapat bervariasi antara 0,1 mL dan 2 mL, tergantung pada ukuran cawan Petri dan volume media pembiakan yang digunakan. Pengenceran harus dipilih sedemikian rupa sehingga jumlah koloni yang terbentuk di cawan dengan diameter 90 mm sampai 100 mm diharapkan antara 10 dan 300 (lihat ISO 7218). Walaupun demikian, perlu dicatat bahwa jumlah total koloni yang dapat dihitung tergantung pada ukuran koloni dan jumlahnya mungkin harus dikurangi untuk koloni yang berukuran besar.

3.28.1.6.1.1.3 Inokulasi

Cairkan media yang dibutuhkan (3.28.1.5.3) dalam penangas air atau cara lain yang sesuai (misal dengan inkubator udara yang sesuai, autoklaf dengan uap air mengalir atau oven *microwave*, apabila kombinasi waktu/suhu pemanasan telah divalidasi untuk pembuatan media). Hindari pemanasan yang berlebihan dan ambil media segera setelah mencair. Tempatkan media cair tersebut di penangas air pada suhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ dalam waktu yang cukup sehingga suhu media sama dengan suhu penangas. Lebih diutamakan untuk tidak menyimpan media di penangas air lebih dari 4 jam. Jangan mencairkan media lebih dari satu kali.

Siapkan dan tandai cawan Petri yang diperlukan. Buat pengenceran yang diperlukan sesuai dengan 3.28.1.6.1.1.1. Setelah dikocok dengan merata, bagikan porsi uji kedalam cawan. Pindahkan setiap tabung atau wadah media yang sudah mencair dari penangas air, keringkan bagian luarnya dan lewatkan bagian lehernya pada api. Tambahkan media ke tiap cawan Petri tanpa menunda untuk meminimalkan porsi uji dari syok karena panas, dan campur dengan hati-hati sehingga diperoleh distribusi mikroorganisme yang merata pada cawan. Umumnya 15 mL media digunakan untuk porsi uji sebanyak 1 mL atau 2 mL. Biarkan cawan memadat pada permukaan datar. Segera sesudah agar memadat, inkubasi cawan sesuai dengan 3.28.1.6.2.

CATATAN Penggunaan alat penyiapan agar di cawan dengan menuang dan menumpuk cawan (*Agar preparator pourer-stacker systems*) dapat dimanfaatkan untuk laboratorium analisa yang mempunyai jumlah contoh yang banyak.

3.28.1.6.2 Inkubasi dan pengamatan

Balikkan cawan dan inkubasi satu set pada $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama (44 ± 4) jam; inkubasi set lainnya pada $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama (68 ± 4) jam.

Amati cawan segera setelah dikeluarkan dari inkubator; apabila tidak memungkinkan simpan pada suhu $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ dan amati dalam waktu 48 jam.

Abaikan setiap cawan yang pertumbuhannya melebar (tidak ada batas sambungan) dan atau berlebihan menutupi cawan.

3.28.1.6.3 Perhitungan koloni

Untuk setiap suhu inkubasi, hitung setiap koloni yang ada di tiap cawan dan perhitungkan estimasi jumlah koloni untuk tiap 1 mL contoh sesuai prosedur yang dijelaskan di ISO 8199 yang tercantum pada 3.28.1.6.3.1 dan 3.28.1.6.3.2.

3.28.1.6.3.1 Enumerasi (ISO 8199)

3.28.1.6.3.1.1 Ketentuan Umum

Amati cawan segera setelah inkubasi. Jika tidak memungkinkan, dapat disimpan pada suhu $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ dalam periode waktu yang pendek (misal beberapa hari) yang dipastikan tidak mempengaruhi terhadap jumlah, penampakan atau konfirmasi koloni. Jika cawan disimpan, lakukan validasi periode penyimpanan sehingga sesuai dengan metode dan jenis contoh.

3.28.1.6.3.1.2 Koloni yang dihitung

Untuk jumlah "total" pada media tidak selektif, semua koloni dihitung.

3.28.1.6.3.2 Perhitungan hasil (dari ISO 8199)

3.28.1.6.3.2.1 Prinsip

Sebagian besar dari subpasal ini diambil dari ISO 7218.

Metode perhitungan yang didefinisikan di bawah ini memperhatikan kasus yang paling sering terjadi ketika pengujian dilakukan sesuai dengan praktek laboratorium yang baik. Meskipun jarang, tetapi kasus khusus dapat terjadi (sebagai contoh, perbedaan signifikan jumlah koloni diantara dua cawan dengan pengenceran sama, atau sangat berbeda rasio dari faktor pengenceran diantara cawan pada dua pengenceran berturut-turut). Oleh karena itu hasil yang diperoleh dari penghitungan pengujian perlu diinterpretasikan atau ditolak oleh seorang ahli mikrobiologi.

3.28.1.6.3.2.2 Kasus umum

Perhitungan hasil pada bagian ini dapat digunakan pada kasus dimana jumlah total koloni pada cawan adalah antara 10 dan 300. Mengingat setiap koloni diasumsikan berasal dari satu mikroorganisme atau dari agregat tunggal mikroorganisme, maka hasil dinyatakan sebagai jumlah koloni dalam satu volume acuan spesifik dari contoh (umumnya 100 mL atau 1 mL) dengan menggunakan persamaan (1):

$$C_s = \frac{Z}{V_{\text{tot}}} \times V_s \quad (1)$$

keterangan :

C_s adalah estimasi jumlah koloni dalam volume V_s contoh;

Z adalah jumlah koloni yang dihitung pada cawan atau pada membran yang diperoleh dari pengenceran d_1, d_2, \dots, d_i , atau diperoleh dari volume tertentu porsi uji (contoh atau pengenceran);

V_s adalah volume acuan yang dipilih untuk menyatakan konsentrasi mikroorganisme dalam contoh;
 V_{tot} adalah total volume contoh awal yang terhitung yang digunakan dalam cawan yang dienumerasi. V_{tot} adalah jumlah volume tertentu porsi uji (contoh atau pengenceran) atau dihitung menggunakan persamaan (2):

$$V_{tot} = (n_1 V_1 d_1) + (n_2 V_2 d_2) + \dots + (n_i V_i d_i) \quad (2)$$

keterangan :

V_{tot} adalah total volume contoh awal terhitung yang digunakan dalam cawan yang dienumerasi
 n_1, n_2, \dots, n_i adalah jumlah cawan yang dihitung untuk pengenceran d_1, d_2, \dots, d_i ;
 V_1, V_2, \dots, V_i adalah volume uji yang digunakan dengan pengenceran d_1, d_2, \dots, d_i ;
 d_1, d_2, \dots, d_i adalah pengenceran yang digunakan untuk volume uji V_1, V_2, \dots, V_i ($d = 1$ untuk contoh yang tidak diencerkan, $d = 0,1$ untuk pengenceran sepersepuluh, dan seterusnya)

CATATAN Dengan demikian hasil akhir yang diperoleh adalah fungsi dari rata-rata tertimbang (*weighted average*) dari jumlah koloni pada setiap cawan.

Kecuali dinyatakan lain, bulatkan hasil hitungan dengan dua angka penting ketika melaporkan hasil akhir. Untuk melakukan hal ini, jika angka ketiga adalah kurang dari 5 bulatkan ke bawah, sedangkan jika angka ketiga lebih besar atau sama dengan 5, maka bulatkan ke atas (satu angka lebih tinggi).

Nyatakan hasil sebagai angka, sebaiknya, antara 1,0 and 9,9 kali pangkat 10 yang sesuai, atau seluruh angka dengan dua angka signifikan.

Contoh perhitungan untuk teknik cawan tuang (dienumerasi secara duplo) adalah sebagai berikut:

CONTOH 1

Jika volume larutan uji yang digunakan (V_i) adalah 1 mL, dan jumlah berikut diperoleh dari pengenceran yang digunakan:

| Pengenceran | Jumlah |
|-------------|-------------------------|
| 10^{-2} | 81 koloni dan 97 koloni |
| 10^{-3} | 9 koloni dan 15 koloni |

maka:

$$Z = 81 + 97 + 9 + 15 = 202$$

$$V_{tot} = (2 \times 1 \times 0,01) + (2 \times 1 \times 0,001) = 0,022$$

Dan jika V_s adalah 1 mL:

$$C_s = \frac{202}{0,022} \times 1 = 9\,182$$

Maka setelah pembulatan: $C_s = 9,2 \cdot 10^3$ koloni/mL.

3.28.1.7 Pernyataan hasil

Nyatakan hasil uji sebagai jumlah koloni per mL (koloni/mL) dari contoh tiap suhu inkubasi.

Apabila tidak ada koloni pada cawan yang diinokulasi dengan volume uji dari contoh yang tidak diencerkan, nyatakan hasilnya sebagai “tidak terdeteksi dalam satu mL”. Apabila ada lebih dari 300 koloni di cawan yang diinokulasi dengan tingkat pengenceran tertinggi, nyatakan hasilnya sebagai > 300 atau hanya sebagai perkiraan.

3.28.1.8 Laporan hasil uji

Laporan hasil uji harus mengacu pada Standar ini dan memberikan semua informasi yang relevan, termasuk :

- semua detil yang diperlukan untuk melengkapi identifikasi contoh
- teknik (cawan tuang) dan media yang digunakan
- waktu dan suhu inkubasi
- hasil perhitungan yang dimunculkan sesuai dengan 3.28.1.7.
- hal-hal khusus lainnya yang diamati selama berlangsungnya analisa dan semua faktor yang berhubungan dengan prosedur yang diikuti
- Lamanya waktu transportasi setelah pengambilan contoh sampai ke laboratorium dan lamanya waktu pengujian setelah contoh diterima di laboratorium (untuk contoh yang diuji lebih dari 8 jam setelah pengambilan contoh)

3.28.2 Bakteri koliform dan *Escherichia coli*

3.28.2.1 Istilah dan definisi

Bakteri koliform

bakteri kelompok *Enterobacteriaceae* yang mampu menghasilkan enzim β -D- galaktosidase

Bakteri *E. coli*

bakteri kelompok *Enterobacteriaceae* yang mampu mengekspresikan enzim β -D- glukuronidase dan β -D-galaktosidase.

3.28.2.2 Prinsip

Menyaring sampel yang hendak diuji menggunakan penyaring membran (*membrane filter*) yang mampu menjerat mikroorganisme, kemudian meletakkan penyaring membran tersebut pada permukaan cawan agar *chromogenic coliform*.

Menginkubasi penyaring membran pada suhu $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama (21 ± 3) jam.

Menghitung jumlah koloni yang menunjukkan positif β -D-galaktosidase (berwarna merah muda hingga merah) yang diduga sebagai koloni bakteri Koliform yang bukan *E. coli*. Untuk menghindari hasil positif palsu, yang disebabkan oleh bakteri yang memiliki aktivitas oksidase, misalnya jenis *Aeromonas* spp., koloni terduga tersebut harus dikonfirmasi dengan ditunjukkannya reaksi oksidase negatif.

Menghitung jumlah koloni yang menunjukkan reaksi positif β -D-glukuronidase dan β -D-galaktosidase yang ditunjukkan dengan adanya koloni berwarna biru tua hingga ungu yang merupakan koloni *E. coli*.

Total bakteri Koliform adalah jumlah seluruh koloni berwarna merah muda hingga merah yang negatif oksidase dan jumlah seluruh koloni berwarna biru tua hingga ungu.

3.28.2.3 Peralatan

Peralatan yang digunakan adalah peralatan yang umum digunakan pada laboratorium uji mikrobiologi.

3.28.2.3.1 Seperangkat alat untuk sterilisasi dengan uap air (autoklaf).

3.28.2.3.2 Inkubator, terkendali secara termostatik pada suhu $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

3.28.2.3.3 pH Meter, dengan tingkat akurasi 0,1 pada suhu $20 ^\circ\text{C}$ sampai dengan $25 ^\circ\text{C}$.

3.28.2.3.4 Seperangkat alat penyaringan membran

3.28.2.3.5 Penyaring membran (*Membrane filter*), terbuat dari bahan *mixed-ester-cellulose* (MCE) dengan ukuran diameter 47 mm atau 50 mm yang memiliki karakter penyaringan yang setara dengan ukuran diameter pori $0,45 \mu\text{m}$. Lebih disukai jika memiliki garis kotak-kotak (*gridded*).

Penyaring membran harus bebas dari kandungan bahan yang dapat menghambat pertumbuhan maupun yang dapat meningkatkan pertumbuhan bakteri. Tinta yang digunakan pada garis kotak-kotak harus tidak memberikan hambatan pada pertumbuhan bakteri. Jika penyaring membran belum dalam keadaan steril, harus disterilkan terlebih dahulu dengan mengikuti petunjuk prosedur sterilisasi dari pabrikan. Setiap *batch* penyaring membran harus sudah teruji, sebab seringkali penggunaan penyaring membran dari merek yang berbeda-beda dapat menyebabkan perbedaan pada nilai kepulihan (*recovery*) maupun pembentukan warna koloni.

3.28.2.3.6 Pinset berujung tumpul steril, digunakan untuk meletakkan penyaring membran

3.28.2.4 Media pembiakan dan pereaksi

Gunakan bahan-bahan dengan kualitas seragam dan bahan kimia dengan kualitas analitik.

Sebagai alternatif, gunakan media pembiakan dan pereaksi komersial yang sesuai dengan komposisi media yang disarankan dan selalu ikuti prosedur penggunaan dari pabrik pembuatnya.

CATATAN Penggunaan bahan kimia yang memiliki *grade* berbeda dapat dimungkinkan jika bahan tersebut menunjukkan performa yang setara saat pengujian.

Untuk pembuatan media pembiakan, gunakan air suling atau air terdeionisasi yang bebas dari bahan-bahan yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri pada kondisi pengujian.

3.28.2.4.1 Media Pembiakan

3.28.2.4.1.1 Chromogenic Coliform Agar (CCA)

| | |
|--|-------|
| Kasein yang dihidrolisa secara enzimatis | 1,0 g |
| <i>Yeast extract</i> | 2,0 g |
| Natrium klorida | 5,0 g |
| Natrium dihidrogen fosfat. $2\text{H}_2\text{O}$ | 2,2 g |
| Di-Natrium hidrogen fosfat | 2,7 g |
| Natrium piruvat | 1,0 g |
| Sorbitol | 1.0 g |

| | |
|--|-------------------------|
| Triptofan | 1,0 g |
| Secondary alcohol ethyloxyate surfactant (CAS No. 68131-40-8) ^a (contoh Tergitol® 15-S-7 surfactant) ^b | 0,15 g |
| 6-Chloro-3-indoxyl-(S-D-galactopyranoside (Salmon-beta-D-galactosid], (CAS No. 138182-21-5] | 0,2 g |
| 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-(S-D-glucuronic acid, cyclohexylammonium salt monohydrate (X-beta-G-glucuronide CHX salt] (CAS No. 114162-64-0] | 0,1 g |
| Isopropyl-(B-D-thiogalactopyranoside (IPTG] (CAS No. 367-93-1] | 0,1 g |
| Agar bakteriologis, bubuk atau serpihan | 9 g - 18 g ^c |
| Air suling | 1 000 mL |

^a Nomor CAS/Nomor Register CAS adalah penunjuk numerik yang unik dari Chemical Abstracts Services (CAS) untuk elemen kimia, senyawa, polimer, sekuen biologis, campuran, dan *alloys*

^b Tergitol adalah suatu contoh produk yang sesuai yang tersedia secara komersial. Informasi ini diberikan untuk kenyamanan pengguna dari Standar ini dan bukan merupakan promosi-terhadap produk ini.

^c Tergantung pada kekuatan mengental dari agar

Larutkan bahan-bahan ke dalam air dengan pemanasan menggunakan penangas air dengan pengadukan hingga seluruh bahan terlarut sempurna (kurang lebih membutuhkan waktu selama 35 menit). Jika diperlukan, lakukan penyesuaian pH sehingga setelah pemanasan diperoleh nilai pH $6,8 \pm 0,2$ pada suhu $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Media tidak boleh diautoklaf maupun terpapar panas berlebihan. Tuang media ke dalam cawan Petri dengan ketebalan paling sedikit 4 mm. Jika tidak langsung digunakan, media dalam cawan Petri dapat disimpan hingga 1 bulan dengan kondisi penyimpanan pada suhu $(5 \pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$, disimpan pada tempat/ruang gelap, dan terlindungi dari resiko penguapan. Ketika akan digunakan harus tidak tampak adanya kondensasi pada permukaan agar. Jika tampak ada kondensasi, cawan Petri harus dikeringkan sedemikian rupa untuk menghilangkan kondensasi tersebut.

3.28.2.4.1.2 Tryptic Soy Agar (TSA)

| | |
|--|-----------|
| Pepton dari kasein | 15 g |
| Pepton dari kedelai | 5 g |
| Natrium klorida | 5 g |
| Agar-agar (dalam bentuk bubuk atau serpihan) | 15 – 25 g |
| Air suling | 1 000 mL |

Larutkan bahan-bahan ke dalam air dengan pemanasan menggunakan penangas air. Jika diperlukan, atur pH sehingga setelah proses autoklaf memiliki nilai pH $7,2 \pm 0,1$ pada suhu $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sterilisasi selama 15 menit pada $(121 \pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$ menggunakan autoklaf. Setelah selesai sterilisasi diamkan hingga suhu media turun sekitar $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan tuang ke dalam cawan Petri dengan ketebalan paling sedikit 4 mm. Jika tidak langsung digunakan, media dalam cawan Petri dapat disimpan hingga 8 minggu dengan kondisi penyimpanan pada suhu $(5 \pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$, disimpan pada tempat/ruang gelap, dan terlindungi dari resiko penguapan.

CATATAN Media tidak selektif lainnya dapat digunakan untuk tahap subpembinaan sebelum dilakukan uji oksidase, jika media tersebut tidak memberikan reaksi interfensi terhadap uji oksidase.

3.28.2.4.2 Pereaksi

Pereaksi oksidase

| | |
|---|-------|
| N', N', N', N' – Tetrametil-p-fenilendiamina dihidroklorida | 0,1 g |
| Air suling | 10 mL |

Pereaksi ini bersifat tidak stabil. Untuk itu, harus selalu dibuat sediaan segar dalam jumlah sedikit sesuai kebutuhan sebelum digunakan dan harus dilindungi dari cahaya.

PERHATIAN :N', N', N', N' – Tetrametil-p-fenilendiamina dihidroklorida adalah bahan yang bersifat karsinogenik (dapat mengakibatkan kanker). Gunakan sarung tangan pelindung yang sesuai dan hindari kontak langsung dengan kulit.

3.28.2.5 Pengambilan contoh

Ambil contoh air sesuai petunjuk pengambilan contoh dan kirim contoh ke laboratorium penguji. Volume contoh air yang diperlukan dalam analisa air minum dalam kemasan adalah 250 mL. Usahakan agar waktu antara pengambilan contoh dan pengujian sesingkat mungkin. Untuk air minum, pengujian sebaiknya dilakukan pada hari yang sama dengan pengambilan contoh. Disarankan untuk melakukan pengujian dalam waktu 8 jam setelah pengambilan contoh.

Untuk contoh yang ditransportasikan lebih dari 8 jam, perlu dimonitor dan dicatat suhunya. Kondisi transportasi harus didokumentasikan. Hal ini karena terkait dengan penundaan waktu pengujian.

Hal hal yang termasuk dalam penundaan waktu pengujian setelah pengambilan contoh adalah transportasi, registrasi dan pengelolaan contoh di laboratorium.

Penundaan waktu antara sampling dan pengujian contoh dapat menurunkan reliabilitas hasil uji. Oleh karena itu, pengambil contoh dan analis harus bekerjasama untuk menetapkan jumlah contoh yang dapat diuji setelah pengambilan contoh. Penundaan waktu harus sesingkat mungkin dan cantumkan dalam laporan hasil uji.

3.28.2.6 Prosedur

3.28.2.6.1 Persiapan Contoh

Untuk persiapan contoh, penyaringan, dan inokulasi pada media isolasi, ikuti instruksi yang terdapat pada ISO 8199 yang tercantum pada 3.28.2.6.1.1, 3.28.2.6.1.2 dan 3.28.2.6.1.3). Contoh harus dikirim dan disimpan pada suhu $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ sebelum pengujian. Pada kondisi khusus, contoh dapat disimpan pada suhu $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ sampai dengan 24 jam sebelum diuji. Dalam hal ini, lama waktu penyimpanan harus disertakan pada laporan pengujian.

3.28.2.6.1.1 Porsi uji (ISO 8199)

Volume maksimum porsi uji tergantung pada kemudahan contoh air untuk disaring dan membran yang digunakan. Teknik ini sesuai untuk air yang mengandung sedikit partikel atau bahan koloid (misalnya besi) dalam suspensi, seperti air minum. Dengan membran yang mempunyai ukuran pori $0,45 \mu\text{m}$, memungkinkan untuk menyaring beberapa liter air melalui membran tunggal, sehingga diperoleh sensitivitas uji dengan tingkat tinggi.

Volume uji dari contoh atau hasil pengenceran contoh sebaiknya dipilih sedemikian rupa sehingga jumlah koloni tipikal yang diharapkan yang tumbuh pada membran dengan diameter 47 mm sampai 50 mm adalah berada di antara 10 dan 100. Jumlah total koloni pada penyaring membran (tipikal dan atipikal) sebaiknya kurang dari 200. Walaupun demikian, sebagai catatan bahwa jumlah total koloni yang dapat dihitung tergantung pada ukuran koloni dan jumlah ini mungkin harus dikurangi untuk koloni yang besar.

3.28.2.6.1.2 Teknik penyaringan (ISO 8199)

Hubungkan perangkat penyaringan steril dengan pompa vakum. Letakkan penyaring membran steril pada bagian berlubang corong penyaring (*funnel*), dengan bagian yang bergaris (*grid*) ke arah atas, menggunakan pinset berujung tumpul steril dan hanya bagian paling luar penyaring membran yang bersentuhan dengan pinset. Posisi corong penyaring steril harus berada dalam keadaan kuat dan rapat pada penyangga corong. Pipet atau tuang sejumlah volume yang sudah diketahui dari contoh atau hasil pengenceran contoh (250 mL) pada penyaring (dengan pengatur vakum (*vacuum stopcock*) dalam keadaan mati).

Buka pengatur vakum dan alirkan vakum yang cukup (sekitar 70 kPa) untuk menyaring air melalui membran. Tutup pengatur vakum segera sesudah contoh tersaring. Dapat disarankan untuk membilas corong penyaring dengan menyaring satu sampai tiga porsi 10 mL sampai 30 mL pengencer steril dalam keadaan penyaring masih terpasang.

3.28.2.6.1.3 Pemindahan membran (ISO 8199)

Lepaskan corong penyaring (yakinkan bahwa pengatur vakum dalam keadaan tertutup sebelum melakukannya) dan pindahkan membran dengan pipet berujung tumpul steril pada media agar.

Untuk volume yang berbeda dengan contoh yang sama, corong penyaring dapat digunakan kembali tanpa didisinfeksi, dengan cara melakukan penyaringan terlebih dahulu terhadap volume contoh yang terkecil dan/atau contoh yang diencerkan paling tinggi. Untuk menyaring contoh yang berbeda, gunakan perangkat penyaringan steril lain atau disinfeksi corong penyaring, misalnya dengan melewati pada api. Sebagai alternatif, ikuti instruksi fabrikasi untuk disinfeksi.

3.28.2.6.2 Penyaringan

Saring sebanyak 250 mL contoh untuk diuji menggunakan penyaring membran (3.28.2.3.5).

3.28.2.6.3 Inkubasi dan Diferensiasi

Setelah penyaringan, letakkan penyaring membran pada permukaan media *Chromogenic Coliform Agar* (CCA). Pastikan tidak terdapat gelembung udara yang terperangkap di bawah penyaring membran. Setelah itu, posisikan cawan Petri pada posisi terbalik, dan inkubasi pada suhu $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama (21 ± 3) jam.

Amati penyaring membran dan hitung semua koloni yang menunjukkan reaksi positif β -D-galaktosidase dengan ditunjukkan adanya koloni berwarna merah muda hingga merah, sebagai terduga bakteri Koliform yang bukan *E. coli*.

Hitung semua koloni yang menunjukkan positif reaksi β -D-glukuronidase dan β -D-galaktosidase yang ditunjukkan dengan adanya koloni berwarna biru tua hingga ungu sebagai koloni bakteri *E. coli*.

Untuk memastikan koloni terduga bakteri Koliform yang bukan *E. coli*, uji konfirmasi oksidase harus dilakukan. Uji ini disarankan dilakukan terhadap semua koloni atau sedikitnya sebanyak 10 koloni berwarna merah muda hingga merah yang dipilih berdasarkan prosedur ISO 8199 yang dituliskan pada 3.28.2.6.3.1. Untuk tahapan uji konfirmasi ini, pereaksi komersial uji oksidase dapat digunakan.

Apabila pereaksi komersial uji oksidase tidak digunakan, uji oksidase dapat dilakukan dengan cara menambahkan sebanyak 2 – 3 tetes pereaksi oksidase segar ke atas kertas

penyaring membran pada permukaan cawan Petri. Koloni-koloni yang harus dikonfirmasi dipindahkan pada kertas saring yang telah ditetesi pereaksi oksidase, menggunakan jarum inokulasi yang terbuat dari bahan plastik atau titanium. Reaksi positif oksidase ditunjukkan dengan munculnya warna biru tua dalam waktu sekitar 30 detik. Reaksi positif ini tidak dimiliki oleh bakteri Koliform karena sifatnya yang negatif oksidase.

Jika terdapat banyak koloni pada permukaan kertas membran atau banyak koloni yang tumbuhnya berdekatan satu sama lain, harus dilakukan tahap subpembiasaan terlebih dahulu sebelum dilakukan uji konfirmasi. Hal ini diperlukan untuk memastikan bahwa uji oksidase dilakukan terhadap biakan murni. Subpembiasaan juga perlu dilakukan jika uji konfirmasi dilakukan kepada koloni yang terlalu kecil ukurannya. Subpembiasaan dilakukan dengan menggunakan media tidak selektif seperti TSA yang diinkubasi pada suhu $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama (21 ± 3) jam.

3.28.2.6.3.1 Koloni yang dihitung dan dikonfirmasi

Pada media selektif dan diferensial, hanya koloni yang menunjukkan penampakan karakteristik yang harus dihitung. Penggunaan kaca pembesar dapat digunakan ketika ukuran koloni kecil dan atau ketika ada kesulitan untuk membedakan koloni bakteri dengan partikel lainnya. Secara umum, hal ini tidak lazim untuk menunjukkan hitungan yang mengindikasikan organisme yang termasuk dalam satu kelompok taksonomi, tetapi secara praktis perbedaan dalam hal ini dapat diterima dan hasil dapat merupakan nilai dugaan (*presumptive*). Untuk karakterisasi yang lebih presisi, perlu dilakukan uji konfirmasi.

Jika terdapat koloni yang banyak, tidaklah praktis untuk mengonfirmasi identitas semua koloni. Dalam hal ini, lakukan uji terhadap semua koloni tipikal yang berasal dari sebagian area cawan atau membran (lihat juga 3.28.2.6.3.3).

3.28.2.6.3.2 Kasus Umum

Perhitungan hasil pada bagian ini dapat digunakan pada kasus dimana jumlah total koloni tipikal pada cawan Petri adalah antara 10 dan 100 (teknik penyaringan membran).

Mengingat setiap koloni diasumsikan berasal dari satu mikroorganisme atau dari agregat tunggal mikroorganisme, maka hasil dinyatakan sebagai jumlah koloni dalam satu volume acuan spesifik dari contoh (umumnya 100 mL atau 1 mL) dengan menggunakan persamaan (3):

$$C_s = \frac{Z}{V_{\text{tot}}} \times V_s \quad (3)$$

keterangan :

- C_s adalah estimasi jumlah koloni dalam volume V_s contoh;
- Z adalah jumlah koloni yang dihitung pada cawan atau pada membran yang diperoleh dari pengenceran d_1, d_2, \dots, d_i , atau diperoleh dari volume tertentu porsi uji (contoh atau pengenceran);
- V_s adalah volume acuan yang dipilih untuk menyatakan konsentrasi mikroorganisme dalam contoh;
- V_{tot} adalah total volume contoh awal yang terhitung yang digunakan dalam cawan yang dienumerasi. V_{tot} adalah jumlah volume tertentu porsi uji (contoh atau pengenceran) atau dihitung menggunakan persamaan (4):

$$V_{\text{tot}} = (n_1 V_1 d_1) + (n_2 V_2 d_2) + \dots + (n_i V_i d_i) \quad (4)$$

keterangan :

- V_{tot} adalah total volume contoh awal terhitung yang digunakan dalam cawan yang dienumerasi

n_1, n_2, \dots, n_i adalah jumlah cawan yang dihitung untuk pengenceran d_1, d_2, \dots, d_i ;
 V_1, V_2, \dots, V_i adalah volume uji yang digunakan dengan pengenceran d_1, d_2, \dots, d_i ;
 d_1, d_2, \dots, d_i adalah pengenceran yang digunakan untuk volume uji V_1, V_2, \dots, V_i ($d = 1$ untuk contoh yang tidak diencerkan, $d = 0,1$ untuk pengenceran sepersepuluh, dan seterusnya)

CATATAN Dengan demikian hasil akhir yang diperoleh adalah fungsi dari rata-rata tertimbang (*weighted average*) dari jumlah koloni pada setiap cawan.

Kecuali dinyatakan lain, bulatkan hasil hitungan dengan dua angka penting ketika melaporkan hasil akhir. Untuk melakukan hal ini, jika angka ketiga adalah kurang dari 5 bulatkan ke bawah, sedangkan jika angka ketiga lebih besar atau sama dengan 5, maka bulatkan ke atas (satu angka lebih tinggi).

Nyatakan hasil sebagai angka, sebaiknya, antara 1,0 and 9,9 kali pangkat 10 yang sesuai, atau seluruh angka dengan dua angka signifikan.

Contoh perhitungan untuk teknik penyaringan membran (denumerasi tunggal) adalah sebagai berikut:

CONTOH

| Volume uji (V_i) | Jumlah |
|----------------------|-----------|
| 100 mL | 82 koloni |
| 10 mL | 11 koloni |

maka:

$$Z = 82 + 11 = 93$$

$$V_{\text{tot}} = (1 \times 100 \times 1) + (1 \times 10 \times 1) = 110$$

Dan jika V_s adalah 100 mL, maka:

$$C_s = \frac{93}{110} \times 100 = 84 \text{ koloni/100 mL}$$

3.28.2.6.3.3 Kasus Sesudah Identifikasi dan Konfirmasi (ISO 8199)

Ketika metode yang digunakan memerlukan identifikasi atau konfirmasi, semua koloni terduga sebaiknya diinokulasi dari setiap cawan yang digunakan untuk menghitung koloni. Jika hal ini tidak mungkin dilakukan, semua koloni tipikal (n) sebaiknya diuji dari sub-area cawan atau membran (n dapat bervariasi dari cawan ke cawan). Alasan utama dalam merekomendasikan untuk melakukan konfirmasi semua koloni terduga dari area tertentu daripada pemilihan secara acak adalah karena laboratorium tidak mungkin dapat melakukan isolasi suatu *subset* acak secara obyektif dari koloni terduga. Jika contoh acak yang reliabel dapat diperoleh, maka jumlah minimum dan sekaligus rata-rata yang memadai untuk monitoring secara rutin dalam melakukan konfirmasi adalah $n = 5$ koloni per cawan. Rekomendasi untuk mengisolasi semua koloni dilakukan jika jumlah koloni antara 1 dan 5. Lebih dari itu, rata-rata $n = 5$ adalah memadai. (Jika jumlah koloni terduga adalah 6 atau 7, tidaklah memadai jika hanya memilih *subset* $n = 5$). Sesudah identifikasi atau konfirmasi, hitung untuk setiap cawan hasil konfirmasi sebagai proporsi dari koloni terduga yang memenuhi kriteria identifikasi atau konfirmasi, menggunakan persamaan (5):

$$x = \frac{k}{n} \times z \quad (5)$$

keterangan:

x adalah perkiraan jumlah koloni terkonfirmasi per cawan;
 k adalah jumlah koloni yang memenuhi kriteria identifikasi atau konfirmasi dari koloni yang diinokulasi n ;
 n adalah jumlah koloni positif terduga yang diinokulasi dari cawan untuk konfirmasi;
 z adalah jumlah total koloni positif terduga yang dihitung pada cawan.
 Jangan lakukan pembulatan terhadap hasil uji sementara yang terkonfirmasi x .

Hitung jumlah C_s mikroorganisme yang teridentifikasi atau terkonfirmasi yang ada dalam contoh uji dengan cara mengganti Z dengan X (jumlah dari x), menggunakan persamaan 3 (3.28.2.6.3.2). Bulatkan dan nyatakan hasilnya sesuai 3.28.2.6.3.2.

CONTOH

Penghitungan menghasilkan hasil sebagai berikut:

| Pengenceran | Jumlah |
|-------------|-------------------------|
| 10^{-3} | 66 koloni dan 80 koloni |
| 10^{-4} | 4 koloni dan 7 koloni |

Konfirmasi terhadap koloni terpilih sudah dilakukan:

dari 66 koloni, 8 koloni diuji, 6 diantaranya memenuhi kriteria; sehingga $x_1 = 6/8 \times 66 = 49,5$;
 dari 80 koloni, 9 koloni diuji, 6 diantaranya memenuhi kriteria; sehingga $x_2 = 53,3$;
 dari 7 koloni, 5 koloni diuji, 4 diantaranya memenuhi kriteria; sehingga $x_3 = 5,6$;
 dari 4 koloni, 4 koloni diuji, dan semuanya (4) memenuhi kriteria; sehingga $x_4 = 4 = z_4 = 4,0$.

$$X = 49,5 + 53,3 + 5,6 + 4,0 = 112,4$$

$$C_s = \frac{Z}{V_{tot}} \times V_s = \frac{112,4}{(2 \times 1 \times 0,001) \times (2 \times 1 \times 0,0001)} \times V_s = \frac{112,4}{0,0022} \times 1 = 51\,091$$

Setelah pembulatan: $C_s = 5,1 \times 10^4$ koloni/mL

3.28.2.7 Pernyataan Hasil

Dari jumlah koloni yang terhitung pada permukaan penyaring membran yang telah terkonfirmasi, hitung jumlah koloni bakteri Koliform dan/atau *E. coli* yang terdapat dalam 250 mL contoh yang disaring sesuai 3.28.2.6.3.3 Penghitungan total bakteri Koliform adalah jumlah dari seluruh koloni merah muda hingga merah yang negatif oksidase ditambah dengan koloni berwarna biru tua hingga ungu. Penghitungan total bakteri *E. coli* adalah jumlah dari seluruh koloni berwarna biru tua hingga ungu.

3.28.2.8 Laporan hasil uji

Laporan hasil uji harus mencantumkan setidaknya-tidaknya informasi berikut:

- Metode uji yang digunakan, termasuk rujukan pada standar ini
- Semua informasi yang diperlukan untuk melengkapi identifikasi contoh
- Hasil yang dinyatakan sesuai dengan 3.28.2.7

- Semua kejadian yang diamati selama analisa dan setiap langkah yang dilakukan yang tidak dispesifikasi dalam standar ini yang dapat mempengaruhi hasil uji.

3.28.3 *Pseudomonas aeruginosa*

3.28.3.1 Istilah dan Definisi

Pseudomonas aeruginosa

mikroorganisme yang tumbuh pada media selektif yang mengandung *cetrimide* dan menghasilkan piosianin, atau mikroorganisme yang tumbuh pada media selektif yang mengandung *cetrimide*, oksidase positif, berfluoresens di bawah radiasi UV (360 ± 20) nm, dan dapat menghasilkan amonia dari *acetamide*

3.28.3.2 Prinsip

3.28.3.2.1 Penyaringan

Contoh air atau hasil pengenceran contoh, dengan volume terukur, disaring melalui penyaring membran 0,45 μm . Penyaring membran ditempatkan pada media selektif dan diinkubasi pada kondisi yang ditentukan untuk media.

3.28.3.2.2 Enumerasi

Jumlah *P. aeruginosa* terduga diperoleh dengan menghitung jumlah koloni tipikal pada penyaring membran setelah inkubasi. Koloni penghasil piosianin dianggap sebagai *P. aeruginosa*, tetapi koloni yang berpendar lain atau koloni coklat kemerahan memerlukan konfirmasi.

3.28.3.2.3 Konfirmasi

Koloni yang membutuhkan konfirmasi yang berasal dari penyaring membran ditumbuhkan ke atas cawan nutrient agar (atau media lain, selama media tersebut tidak selektif dan tidak mengandung karbohidrat yang dapat difermentasi). Sesudah inkubasi, biakan yang awalnya tidak berfluoresens diuji untuk reaksi oksidase, sedangkan biakan yang positif-oksidase diuji untuk produksi fluoresein dan kemampuan untuk menghasilkan amonia dari *acetamide*. Biakan yang awalnya berpendar, diuji untuk kemampuan pembentukan amonia dari *acetamide*.

3.28.3.3 Pengencer, media pembiakan dan pereaksi

Gunakan pereaksi dengan kualitas analitis dalam penyiapan media pembiakan dan pengencer, kecuali jika dispesifikasi khusus. Persiapkan media sesuai petunjuk dan tambahkan bahan selektif sebagai suplemen dengan konsentrasi yang telah ditentukan, atau gunakan media dan pereaksi komersial dan ikuti instruksi dari pabrikan. Untuk pembuatan media dan pereaksi, gunakan air *grade 3* seperti yang dispesifikasi pada Tabel 14, atau air yang mempunyai kemurnian setara dan bebas dari bahan-bahan yang mungkin menghambat pertumbuhan pada kondisi pengujian.

3.28.3.3.1 Media pembiakan

3.28.3.3.1.1 Media pembiakan untuk uji pendugaan

a) Pseudomonas agar base/CN-agar

| | |
|---|----------------------|
| Pepton gelatin | 16,0 g |
| Hidrolisat kasein | 10,0 g |
| Kalium sulfat (anhidrat) (K_2SO_4) | 10,0 g |
| Magnesium klorida (anhidrat) ($MgCl_2$) | 1,4 g |
| Gliserol | 10 mL |
| Agar | 11,0 g sampai 18,0 g |
| Air suling atau yang setara | 1 000 mL |

CATATAN jumlah agar yang diperlukan tergantung pada kekuatan gel. Ikuti instruksi dari pabrikan untuk penggunaan agar.

b) Suplemen CN

| | |
|--|---------|
| <i>Hexadecyltrimethyl ammonium bromide (cetrimide)</i> | 0,2 g |
| Asam Nalidiksate | 0,015 g |

Suspensikan pepton, hidrolisat kasein, kalium sulfat, magnesium klorida dan agar dalam 1 000 mL air suling (atau yang setara). Tambahkan 10 mL gliserol. Panaskan sampai mendidih untuk melarutkan sempurna dan sterilisasi dengan autoklaf pada $(121 \pm 3)^\circ C$ selama 15 menit. Biarkan media turun suhunya sampai $(45 \text{ sampai } 50)^\circ C$. Tambahkan 2 mL air suling steril ke dalam suplemen CN, kocok rata dan tambahkan ke media basal cair steril. Campurkan hingga merata dan tuang ke dalam cawan Petri sehingga menghasilkan ketebalan agar sedikitnya 5 mm. pH akhir media padat harus sesuai $(7,1 \pm 0,2)$ pada $25^\circ C$. Simpan cawan-cawan yang telah siap dalam gelap, lindungi dari pengeringan pada $(5 \pm 3)^\circ C$ dan gunakan dalam 1 bulan. Jangan menyimpan agar cair selama lebih dari 4 jam. Jangan mencairkan kembali media.

3.28.3.3.1.2 Media dan pereaksi untuk uji konfirmasi

a) Media King's B

| | |
|---|----------|
| Pepton | 20,0 g |
| Gliserol | 10 mL |
| Di-kalium hidrogen posfat (K_2HPO_4) | 1,5 g |
| Magnesium sulfat heptahidrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) | 1,5 g |
| Agar | 15,0 g |
| Air suling (atau yang setara) | 1 000 mL |

Larutkan bahan dalam air dengan pemanasan. Dinginkan sampai $(45 \text{ sampai } 50)^\circ C$ dan atur pH $7,2 \pm 0,2$ pada $25^\circ C$, menggunakan asam klorida atau natrium hidroksida. Tuang 5 mL ke dalam tabung reaksi bertutup dan autoklaf pada $(121 \pm 3)^\circ C$ selama 15 menit. Biarkan tabung-tabung dingin dan menjadi padat dalam bentuk agar miring. Simpan dalam gelap pada suhu $(5 \pm 3)^\circ C$ dan gunakan dalam jangka waktu 3 bulan.

b) Acetamide broth

| | |
|--|-------|
| Larutan A | |
| Kalium di-hidrogenposfat (KH_2PO_4) | 1,0 g |
| Magnesium sulfat (anhidrat) ($MgSO_4$) | 0,2 g |
| Acetamide | 2,0 g |
| Natrium klorida (NaCl) | 0,2 g |

| | |
|--|--------|
| Air suling (atau yang setara, bebas ammonia) | 900 mL |
|--|--------|

Larutkan bahan dalam air dan kemudian atur pH $7,0 \pm 0,5$ pada $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ menggunakan asam klorida atau natrium hidroksida.

PERHATIAN: Acetamide adalah bahan yang bersifat karsinogenik (dapat menyebabkan kanker) dan iritasi — tindakan pencegahan yang tepat harus diambil ketika menimbang, mempersiapkan dan membuang media.

| | |
|--|--------|
| Larutan B | |
| Natrium molibdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) | 0,5 g |
| Besi sulfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 0,05 g |
| Air suling | 100 mL |

Untuk mempersiapkan *acetamide broth*, tambahkan 1 mL larutan B ke 900 mL larutan A yang baru disiapkan. Tambahkan air dengan pengadukan konstan sampai volume total 1 L. Tuang sebanyak 5 mL campuran ini ke dalam tabung reaksi lalu tutup dan sterilisasi dengan autoklaf pada $(121 \pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit. Simpan dalam gelap pada $(5 \pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan gunakan dalam waktu 3 bulan.

c) *Nutrient agar*

| | |
|------------------------|----------|
| Pepton | 5,0 g |
| <i>Meat extract</i> | 1,0 g |
| <i>Yeast extract</i> | 2,0 g |
| Natrium klorida (NaCl) | 5,0 g |
| Agar | 15,0 g |
| Air suling | 1 000 mL |

Larutkan bahan dalam air dengan pemanasan. Sterilisasi dengan autoklaf pada $(121 \pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit. pH media padat harus sesuai $(7,4 \pm 0,2)$ pada $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Keringkan cawan-cawan untuk menghilangkan kelebihan kondensat pada permukaan sebelum digunakan. Simpan cawan-cawan yang siap dalam gelap terlindung dari pengeringan pada $(5 \pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$ dan gunakan dalam 1 bulan.

d) *Pereaksi oksidase*

| | |
|--|-------|
| Tetrametil-p-fenilendiamina dihidroklorida | 0,1 g |
| Air suling | 10 mL |

Larutkan Tetrametil-p-fenilendiamina dihidroklorida dalam air segera sebelum digunakan dan lindungi dari cahaya. Pereaksi ini tidak stabil. Siapkan segar dalam jumlah kecil sebelum digunakan. Cara lain, gunakan uji oksidase yang tersedia secara komersial.

e) *Pereaksi Nessler*

| | |
|-------------------------------------|---------------|
| Merkuri klorida (HgCl_2) | 10 g |
| Kalium yodida (KI) | 7 g |
| Natrium hidroksida | 16 g |
| Air suling (bebas amonia) | Sampai 100 mL |

Larutkan 10 g HgCl_2 dan 7 g KI dalam sedikit air dan pelan-pelan tambahkan campuran ini, dengan pengadukan, ke larutan 16 g NaOH yang dilarutkan dalam 50 mL air yang telah dingin. Encerkan sampai 100 mL. Simpan dalam gelas borosilikat bertutup karet hindari dari sinar matahari selama maksimum 1 tahun

PERHATIAN: HgCl_2 adalah senyawa yang bersifat toksik, jangan sampai tertelan

3.28.3.4 Peralatan

3.28.3.4.1 Alat gelas

Sterilisasi seluruh peralatan gelas pada $(170 \pm 5)^\circ\text{C}$ selama 1 jam dalam oven kering atau $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ selama 15 menit dalam autoklaf sebelum digunakan

3.28.3.4.2 Inkubator yang dapat mempertahankan suhu $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$;

3.28.3.4.3 Lampu ultra violet (UV) yang dapat memancarkan radiasi panjang gelombang (360 ± 20) nm;

3.28.3.4.4 Penyaring membran steril, dengan ukuran diameter pori $0,45\ \mu\text{m}$

3.28.3.5 Pengambilan contoh

Ambil contoh air sesuai dengan instruksi pengambilan, pengawetan dan penanganan contoh.

3.28.3.6 Prosedur

3.28.3.6.1 Persiapan contoh uji

Lakukan teknik penyaringan membran sesuai petunjuk pada ISO 8199 yang tercantum pada 3.28.2.6.1.2 dan 3.28.2.6.1.3.

3.28.3.6.2 Penyaringan membran dan inkubasi

Gunakan sebanyak 250 mL contoh air minum dalam kemasan.

Saring sejumlah volume contoh air di atas atau hasil pengenceran contoh melalui penyaring membran *cellulose ester* steril dengan diameter pori setara dengan $0,45\ \mu\text{m}$. Tempatkan masing-masing membran di atas cawan Petri yang berisi CN agar, pastikan tidak ada udara yang terperangkap di bawah membran.

Inkubasi cawan-cawan Petri pada $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ selama (44 ± 4) jam dalam wadah dan lindungi terhadap pengeringan.

3.28.3.6.3 Pengamatan membran

Amati pertumbuhan pada membran sesudah (22 ± 2) jam dan (44 ± 4) jam.

Hitung semua koloni yang menghasilkan warna biru/hijau (piosianin) sebagai *P. aeruginosa* terkonfirmasi.

Periksa membran di bawah radiasi UV (360 ± 20) nm. Sebagai catatan, periode berkepanjangan di bawah sinar UV harus dihindari, jika tidak, koloni dapat terbunuh dan gagal tumbuh pada media konfirmasi. Hitung semua koloni yang berpendar tetapi tidak menghasilkan piosianin (non-piosianin) sebagai *P. aeruginosa* terduga dan lakukan uji konfirmasi dengan menggunakan *acetamide broth* seperti yang dijelaskan di bawah ini.

Hitung semua koloni lain berpigmen coklat kemerahan yang tidak berpendar sebagai *P. aeruginosa* terduga dan lakukan uji konfirmasi dengan menggunakan uji oksidase, *acetamide broth*, dan media King'B seperti yang dijelaskan di bawah ini. Pembacaan

setelah (22 ± 2) jam dilakukan jika pertumbuhan koloni terlalu cepat, sehingga penggabungan koloni yang mungkin terjadi setelah (44 ± 4) jam dapat dihindari.

Langkah-langkah untuk uji konfirmasi dirangkum dalam Tabel 16 .

Tabel 16 – Langkah-langkah yang diperlukan untuk konfirmasi dari koloni-koloni yang tumbuh di CN agar

| Karakteristik koloni pada CN agar | Amonia dari <i>acetamide</i> | Produksi oksidase | Pendaran pada King's B | Terkonfirmasi sebagai <i>P.aeruginosa</i> |
|-----------------------------------|------------------------------|-------------------|------------------------|---|
| Biru/hijau | Tidak diuji | Tidak diuji | Tidak diuji | Ya |
| Berpendar (tidak Biru/hijau) | + | Tidak diuji | Tidak diuji | Ya |
| Cokelat kemerahan | + | + | + | Ya |
| Jenis lain | Tidak diuji | Tidak diuji | Tidak diuji | Tidak |

3.28.3.6.4 Konfirmasi

3.28.3.6.4.1 Nutrient Agar

Subbiakan semua atau sebanyak mungkin koloni yang diperlukan untuk uji konfirmasi dari penyaring membran ke permukaan media *Nutrient agar* dalam cawan Petri dan inkubasi selama (22 ± 2) jam pada (36 ± 2) °C. Uji kemurnian koloni yang di subbiakan dan uji koloni yang pada awalnya cokelat kemerahan untuk uji reaksi oksidase.

3.28.3.6.4.2 Uji oksidase

Letakkan 2 sampai 3 tetes pereaksi oksidase segar ke atas kertas saring dalam cawan Petri. Dengan jarum inokulasi kawat platina (bukan Ni chrome), jarum inokulasi plastik, batang atau batang kaca, oleskan koloni yang tumbuh pada kertas saring yang tersedia. Lihat munculnya warna biru-ungu dalam 10 detik sebagai reaksi positif. Cara lain, gunakan uji oksidase yang tersedia secara komersial mengikuti instruksi dari pabrikan.

3.28.3.6.4.3 Media King's B

Subbiakan, biakan cokelat kemerahan yang positif oksidase yang diperoleh dari butir 3.28.3.6.4.1 (*Nutrient agar*) ke atas media King's B dan inkubasi sampai 5 hari pada (36 ± 2) °C. Periksa pertumbuhan setiap hari di bawah radiasi UV dan catat adanya pendaran. Catat pendaran yang muncul sampai hari kelima sebagai hasil positif.

3.28.3.6.4.4 *Acetamide broth*

Inokulasi tabung dengan subbiakan dari butir 3.28.3.6.4.1 (*Nutrient agar*), dan inkubasi pada (36 ± 2) °C selama (22 ± 2) jam. Tambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi Nessler dan periksa tabung yang memproduksi amoniak, dicirikan oleh produksi warna bervariasi dari kuning sampai merah bata tergantung pada konsentrasi.

3.28.3.6.4.5 Enumerasi

Hitung semua koloni yang dikonfirmasi sebagai *P. aeruginosa*, yaitu yang menghasilkan piosianin (pigmen biru/hijau), oksidase positif, berpendar di bawah sinar UV dan dapat menghasilkan amoniak dari *acetamide*.

CATATAN koloni-koloni yang berpendar pada membran utama adalah selalu positif oksidase sehingga mereka tidak perlu diuji untuk parameter ini (lihat tabel 16).

3.28.3.7 Pernyataan hasil

Dari jumlah koloni-koloni tipikal yang dihitung dari penyaring membran berdiameter pori 0,45 μm , dan memperhitungkan proporsi uji konfirmasi yang dilakukan, hitung jumlah *P. aeruginosa* yang dikonfirmasi ada dalam volume air. Nyatakan hasilnya dalam koloni /250 mL.

CONTOH

Jika

- P adalah jumlah koloni biru/hijau; semua dihitung sebagai target terkonfirmasi;
- F adalah jumlah koloni yang berpendar;
- R adalah jumlah koloni cokelat kemerahan;
- n_F adalah jumlah koloni berpendar yang diuji untuk produksi ammonia;
- c_F adalah jumlah koloni berpendar yang positif untuk produksi ammonia;
- n_R adalah jumlah koloni cokelat kemerahan yang diuji untuk ammonia dan produksi oksidase dan berpendar di atas King's B;
- c_R adalah jumlah koloni cokelat kemerahan yang positif untuk ammonia dan produksi oksidase dan berpendar di atas King's B;

Maka, jumlah *P. aeruginosa* adalah sama (setara) dengan $P + F(c_F/n_F) + R (c_R/n_R)$ per volume contoh yang diuji.

3.28.3.8 Laporan hasil uji

Laporan hasil uji harus menspesifikasi hal-hal berikut:

- Metode uji yang digunakan, termasuk rujukan pada standar ini
- semua informasi yang diperlukan untuk melengkapi identifikasi contoh
- hasil yang dinyatakan sesuai dengan 3.28.3.7
- semua kejadian yang diamati selama analisa dan setiap langkah yang dilakukan yang tidak dispesifikasi dalam standar ini yang dapat mempengaruhi hasil uji.

3.28.4 Enterococci

3.28.4.1 Istilah dan definisi

Enterococci intestinal

bakteri yang dapat mereduksi 2,3,5-trifeniltetrazolium klorida menjadi formazan dan menghidrolisa eskulin (*aesculin*) pada suhu 44 °C pada media yang tercantum pada standar ini

3.28.4.2 Prinsip

3.28.4.2.1 Penyaringan, inkubasi dan enumerasi

Enumerasi *enterococci* intestinal didasarkan pada penyaringan contoh air dengan volume tertentu melalui penyaring membran dengan ukuran pori (0,45 μm) yang cukup untuk menahan bakteri. Penyaring membran diletakkan pada media selektif padat yang mengandung natrium azida (untuk menekan pertumbuhan bakteri Gram-negatif) dan 2,3,5 - trifeniltetrazolium klorida, bahan pewarna yang tidak berwarna/pucat (*colourless dye*) yang akan direduksi oleh *enterococci* intestinal menjadi formazan berwarna merah.

Koloni tipikal berwarna merah, marun atau merah muda, baik di bagian tengah koloni ataupun keseluruhan koloni.

3.28.4.2.2 Konfirmasi

Jika ditemukan koloni tipikal, tahap konfirmasi harus dilakukan dengan memindahkan membran yang mengandung sejumlah koloni ke dalam agar *bile-aesculin-azide*, yang telah dipanaskan terlebih dahulu pada suhu 44 °C. *Enterococci intestinal* menghidrolisa eskulin pada media ini dalam waktu 2 jam. Hasil akhir, 6,7-*dihydroxycoumarin*, bereaksi dengan ion besi (III) menghasilkan senyawa berwarna cokelat kehitaman yang terdifusi ke dalam media.

3.28.4.3 Peralatan

Peralatan gelas harus disterilisasi kecuali peralatan steril sekali pakai.

Peralatan laboratorium mikrobiologi yang digunakan:

3.28.4.3.1 Seperangkat alat penyaring membran

3.28.4.3.2 Penyaring membran steril, ukuran pori 0,45 µm

Kualitas penyaring membran sangat bervariasi dari berbagai merek dagang atau dari *batch* ke *batch*. Oleh karena itu disarankan untuk memeriksa kualitasnya secara berkala.

3.28.4.3.3 Inkubator, yang dapat mempertahankan suhu pada (36 ± 2) °C

3.28.4.3.4 Inkubator, yang dapat mempertahankan suhu pada (44 ± 0,5) °C

3.28.4.3.5 Autoklaf, yang dapat mempertahankan suhu pada (121 ± 3) °C

3.28.4.3.6 Pinset berujung tumpul steril, digunakan untuk meletakkan penyaring membran steril

3.28.4.3.7 Hotplate atau penangas air (*water bath*) yang dapat mempertahankan suhu pada 100 °C

3.28.4.4 Media pembiakan dan pereaksi

3.28.4.4.1 Bahan dasar

PERHATIAN - Media selektif yang dijelaskan dalam standar ini mengandung natrium azida. Karena bahan tersebut sangat toksik dan mutagenik, perlu diperhatikan untuk mencegah kontak, terutama terhirup pada saat penyiapan media komersial. Media yang mengandung azida tidak boleh dicampur dengan asam anorganik kuat karena dapat menimbulkan hidrogen azida yang bersifat toksik (HN₃). Larutan yang mengandung azida dapat menyebabkan ledakan ketika kontak dengan pipa metal, misalnya wastafel.

Azida dapat terurai aman dengan penambahan larutan nitrit jenuh yang berlebih.

Untuk keseragaman hasil, dalam menyiapkan media, dapat menggunakan media dehidrat, atau media racikan yang kualitasnya setara dan bahan kimia yang kualitasnya analitik. Natrium azida mudah rusak sehingga media dehidrat mempunyai umur simpan terbatas.

CATATAN Gunakan bahan kimia atau bahan lain yang mempunyai kualitas yang baik seperti yang ditunjukkan pada uji kinerja media.

3.28.4.4.2 Air suling atau setara air murni sesuai dengan Tabel 17 (sesuai ISO 3636), *Grade 1*.

Tabel 17 - Persyaratan air *grade 1* (ISO 3696)

| Parameter | Spesifikasi <i>grade 1</i> |
|---|----------------------------|
| Nilai pH pada suhu 25 °C (<i>inclusive range</i>) | tidak aplikatif |
| Konduktivitas listrik maksimum (mS/m pada suhu 25 °C) | 0,01 |
| Kandungan maksimum unsur oksigen <i>oksidizable</i> (mg/L) | tidak aplikatif |
| Absorbansi maksimum pada panjang gelombang 254 nm dan panjang jarang optik 1 cm (unit absorbansi) | 0,001 |
| Residu maksimum setelah penguapan pada pemanasan 110 °C (mg/kg) | tidak aplikatif |
| Kandungan Silika (SiO ₂) maksimum (mg/L) | 0,01 |

3.28.4.4.3 Media pembiakan

3.28.4.4.3.1 Media *Slanetz & Bartley*

3.28.4.4.3.1.1 Media basal

| | |
|--|--------------------------|
| Triptosa | 20,0 g |
| <i>Yeast extract</i> | 5,0 g |
| Glukosa | 2,0 g |
| Dikalium hidrogenfosfat (K ₂ HPO ₄) | 4,0 g |
| Natrium azide (NaN ₃) | 0,4 g |
| Agar | 8 g - 18 g ¹⁾ |
| Air suling <i>grade 1</i> | 1 000 mL |

Larutkan semua bahan dalam air mendidih sampai larut sempurna, panaskan selama 5 menit. Dinginkan sampai suhu 50 °C hingga 60 °C.

CATATAN¹⁾ Tergantung pada kekuatan gel agar

3.28.4.4.3.1.2 Larutan trifeniltetrazolium klorida (TTC)

| | |
|-----------------------------------|--------|
| 2,3,5-trifeniltetrazolium klorida | 1 g |
| Air suling | 100 mL |

Larutkan indikator dalam air dengan pengadukan.

Sterilisasi dengan penyaringan (0,2 µm).

Lindungi larutan dari cahaya dan buang jika berubah warna menjadi merah muda.

3.28.4.4.3.1.3 Media lengkap

| | |
|------------------------------|----------|
| Basal media (3.28.4.4.3.1.1) | 1 000 mL |
| Larutan TTC (3.28.4.4.3.1.2) | 10 mL |

Tambahkan larutan TTC ke dalam media basal yang bersuhu 50 °C sampai dengan 60 °C.

Atur pH jika perlu, sehingga setelah sterilisasi mempunyai pH (7,2 ± 0,1) pada suhu 25 °C, dengan menambahkan larutan natrium karbonat (100 g/L) atau natrium hidroksida (40 g/L) atau asam klorida (36,5 g/L).

Tuang 20 mL media ke dalam cawan Petri berdiameter 9 cm (atau sesuaikan volume dengan cawan ukuran lain) dan biarkan sampai dingin pada permukaan datar.

Cawan Petri yang telah berisi media dapat disimpan di tempat gelap sampai 2 minggu pada suhu $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

3.28.4.4.3.2 Agar *Bile aesculin azide*

| | |
|----------------------------------|--------------------------|
| Trypton | 17,0 g |
| Pepton | 3,0 g |
| <i>Yeast extract</i> | 5,0 g |
| <i>Ox bile dehydrated</i> | 10,0 g |
| Natrium klorida (NaCl) | 5,0 g |
| Eskulin (<i>aesculin</i>) | 1,0 g |
| Amonium besi (III) sitrat | 0,5 g |
| Natrium azide (NaN_3) | 0,15 g |
| Agar | 8 g - 18 g ¹⁾ |
| Air suling grade 1 | 1 000 mL |

Larutkan semua bahan dalam air dengan pemanasan sampai mendidih.

Atur pH sehingga setelah sterilisasi mempunyai nilai pH $(7,1 \pm 0,1)$ pada suhu 25°C .

Sterilisasi selama 15 menit pada suhu $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$.

Dinginkan sampai suhu 50°C – 60°C dan tuang kedalam cawan Petri dengan ketebalan 3 mm - 5 mm dan biarkan sampai dingin pada permukaan datar.

Cawan Petri yang telah berisi media dapat disimpan pada suhu $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ sampai 2 minggu.

3.28.4.5 Pengambilan contoh

Pengambilan contoh dilakukan sesuai dengan prosedur yang ditetapkan.

3.28.4.6 Prosedur

3.28.4.6.1 Persiapan contoh

Siapkan contoh, saring dan inokulasi pada media isolasi sesuai petunjuk yang ditetapkan. Sebaiknya pengujian segera dilakukan setelah pengambilan contoh. Jika contoh disimpan pada suhu kamar, pengujian harus dilakukan dalam 6 jam setelah pengambilan contoh. Pada kondisi tertentu diperbolehkan untuk menyimpan pada suhu $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ hingga 24 jam sebelum pengujian.

Volume contoh air secara umum dalam analisa air dalam kemasan dibutuhkan 250 mL.

3.28.4.6.2 Penyaringan dan inkubasi

Untuk deskripsi secara umum mengenai teknik penyaringan membran, lihat ISO 8199 yang tercantum pada 3.28.2.6.1.2 dan 3.28.2.6.1.3. Saring 250 mL contoh air.

Letakkan penyaring membran pada media *Slanetz & Bartley* (3.28.4.4.3.1)

Inkubasi cawan pada suhu $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama (44 ± 4) jam.

3.28.4.6.3 Konfirmasi dan enumerasi

Sesudah inkubasi, semua koloni yang tumbuh yang berwarna merah, marun atau merah muda, baik di bagian tengah koloni ataupun keseluruhan koloni, dinyatakan sebagai koloni tipikal.

Jika ditemukan koloni tipikal, pindahkan penyaring membran dan koloni dengan menggunakan pinset berujung tumpul steril tanpa membalik membran pada cawan agar *bile aesculin azide* yang telah dipanaskan pada suhu 44°C.

Inkubasi pada suhu (44 ± 0,5) °C selama 2 jam.

Baca cawan secepatnya.

Seluruh koloni tipikal yang memperlihatkan warna coklat kehitaman di sekitar media dinyatakan sebagai reaksi positif dan dihitung sebagai *enterococci* intestinal.

CATATAN Penyebaran koloni yang tidak merata atau adanya pertumbuhan yang padat dari bakteri dapat mengganggu penghitungan dalam membedakan koloni positif, karena terjadinya difusi warna pada koloni yang berdekatan.

3.28.4.7 Pernyataan hasil

Dari jumlah koloni yang terhitung pada permukaan penyaring membran yang telah terkonfirmasi, hitung jumlah koloni *enterococci* intestinal yang terdapat dalam 250 mL contoh yang disaring.

3.28.4.8 Laporan hasil uji

Laporan hasil uji sebaiknya berisi informasi sebagai berikut:

- metode uji yang digunakan, termasuk rujukan pada standar ini;
- keterangan lengkap yang diperlukan untuk identifikasi contoh uji;
- jumlah koloni yang dikonfirmasi sebagai *enterococci* intestinal;
- fenomena tertentu yang diamati selama analisa dan kegiatan spesifik yang tidak tertuang di dalam metode atau pertimbangan yang dijadikan pilihan yang dapat memodifikasi hasil uji.

3.28.5 Bakteri anaerob pereduksi sulfit pembentuk spora

3.28.5.1 Definisi

Clostridia

mikroorganisme anaerob pembentuk spora dan pereduksi sulfit yang termasuk dalam famili *Bacillaceae* dan genus *Clostridium*

3.28.5.2 Prinsip

Deteksi spora Bakteri anaerob pereduksi sulfit pembentuk spora (clostridia) dalam air memerlukan tahapan sebagai berikut.

3.28.5.2.1 Pemilihan spora

Pemilihan spora dilakukan dengan cara memanaskan contoh dalam waktu yang cukup untuk membunuh bakteri vegetatif.

3.28.5.2.2 Penyaringan membran dan pembiakan

Penyaringan contoh air dengan menggunakan penyaring membran berukuran pori 0,2 µm sehingga spora-spora bakteri tertahan pada penyaring membran.

Meletakkan penyaring membran pada media selektif (*sulfite-iron-agar*), kemudian menginkubasi pada suhu $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ selama (20 ± 4) jam dan (44 ± 4) jam dan menghitung setiap koloni yang berwarna hitam.

3.28.5.3 Media pembiakan dan pereaksi

3.28.5.3.1 Bahan-bahan dasar

Untuk meningkatkan reproduibilitas hasil pengujian disarankan pada persiapan pengencer dan media pembiakan menggunakan komponen dasar dehidrat (*dehydrated basic*) atau dehidrat lengkap (*complete dehydrated*). Media komersial dapat juga digunakan dan harus mengikuti petunjuk yang ditetapkan oleh pabrikan.

Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk media pembiakan dan pereaksi harus berkualitas analitik.

Air yang digunakan harus air suling atau air deionisasi, bebas dari unsur - unsur yang mungkin menghambat pertumbuhan mikroorganisme sesuai dengan kondisi pengujian (lihat ISO 3696).

Pengukuran pH harus dilakukan dengan menggunakan pH meter pada suhu 25 °C.

Jika media pembiakan yang disiapkan tidak langsung digunakan, maka harus disimpan dalam ruang gelap pada suhu sekitar 4 °C selama tidak lebih dari 1 bulan.

3.28.5.3.2 Sulfite-Iron-Agar

3.28.5.3.2.1 Media basal (*nutrient agar*)

| | |
|------------------------|---------|
| <i>Meat extract</i> | 3 g |
| Pepton | 10 g |
| Natrium Klorida (NaCl) | 5 g |
| Agar | 15 g |
| Air suling | 1000 mL |

Panaskan sampai larut, tambahkan air hingga volume 1 liter, dan atur pH $(7,6 \pm 0,1)$ dengan larutan Natrium hidroksida 1 mol/L. Sterilisasi pada suhu $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ dalam autoklaf selama 20 menit.

Simpan dalam refrigerator setelah memadat.

3.28.5.3.2.2 Larutan Natrium Sulfit (Na_2SO_3)

Larutkan 10 gram natrium sulfit dalam 100 mL air suling.

Disarankan larutan dibuat segar, setiap 2 minggu.

3.28.5.3.2.3 Larutan besi (II) sulfat (FeSO_4)

Larutkan 8 gram kristal besi (II) sulfat dalam 100 mL air suling.

3.28.5.3.2.4 Media lengkap

Segera sebelum digunakan cairkan media dasar (3.28.5.3.2.1) dan pada setiap 18 mL volume tambahkan 1 mL larutan natrium sulfit (3.28.5.3.2.2) dan 5 tetes larutan besi (II) sulfat (3.28.5.3.2.3).

Tambahkan 1 mL larutan natrium sulfit dan 5 tetes larutan besi (II) sulfat ke tabung berisi agar sebelum melakukan prosedur berikutnya (lihat 3.28.5.6.3).

3.28.5.3.3 Tryptose-sulfite-Agar (media alternatif)

| | |
|--------------------------|----------|
| Triptosa | 15 g |
| Soytone | 5 g |
| Yeast extract | 5 g |
| Natrium metabisulfit | 1 g |
| Amonium besi (II) sitrat | 1 g |
| Air suling | 1 000 mL |

Panaskan sampai larut, dan atur pH hingga $(7,6 \pm 0,1)$ pada suhu 25°C .

Tuangkan 18 mL ke dalam tabung reaksi. Sterilisasi media pada suhu $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$ selama 15 menit.

Simpan dalam refrigerator pada suhu 4°C sampai dengan 5°C .

Buang media yang tidak digunakan setelah 2 minggu persiapan.

3.28.5.4 Peralatan dan peralatan gelas

Peralatan umum laboratorium mikrobiologi, dan

- 3.28.5.4.1** Peralatan gelas (labu Erlenmeyer, labu beralas bulat atau labu conical) kapasitas 2 liter
- 3.28.5.4.2** Tabung reaksi, ukuran 160 mm x 16 mm.
- 3.28.5.4.3** Pipet ukur, kapasitas 10 mL ketelitian 0,1 mL.
- 3.28.5.4.4** Pipet volumetrik, kapasitas 10 mL.
- 3.28.5.4.5** Jars, kapasitas 1 liter.
- 3.28.5.4.6** Penangas air (*Water bath*).
- 3.28.5.4.7** Seperangkat alat penyaringan membran.
- 3.28.5.4.8** Penyaring membran steril, ukuran pori $0,2\ \mu\text{m}$.

CATATAN Kualitas penyaring membran sangat bervariasi dari berbagai merk dagang atau dari *batch* ke *batch*. Oleh karena itu disarankan untuk memeriksa mutunya secara berkala.

3.28.5.4.9 Inkubator, yang dapat mempertahankan suhu pada $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

3.28.5.4.10 Cawan Petri

3.28.5.5 Pengambilan contoh

Mengacu tentang teknik pengambilan contoh yang ditetapkan.

3.28.5.6 Prosedur

3.28.5.6.1 Penanganan contoh

Volume contoh air secara umum dalam analisa air dalam kemasan dibutuhkan 250 mL.

3.28.5.6.2 Seleksi spora (teknik)

Sebelum melakukan pengujian, contoh air harus dipanaskan pada penangas air dengan suhu $(75 \pm 5) ^\circ\text{C}$ selama 15 menit mulai dari saat tercapainya suhu tersebut. Untuk memeriksa waktu pemanasan yang diperlukan, wadah berisi contoh dengan volume yang sama sebaiknya digunakan secara periodik sebagai kontrol. Suhu air dalam wadah kontrol dapat diukur dengan termometer.

3.28.5.6.3 Inokulasi dan inkubasi

Deskripsi umum teknik penggunaan penyaring membran mengacu pada prosedur yang tercantum pada 3.28.2.6.1.2 dan 3.28.2.6.1.3.

Saring contoh air sebanyak 50 mL volume.

Setelah disaring pindahkan membran dengan pinset berujung tumpul steril dan letakkan pada cawan Petri. Pastikan tidak ada gelembung udara di bawah penyaring membran. Kemudian dengan hati-hati tuang 18 mL media lengkap yang berbentuk cair, yang sebelumnya didinginkan sekitar $50 ^\circ\text{C}$ di atas membran yang ditahan dengan pinset berujung tumpul steril. Setelah memadat, inkubasi secara anaerob atau kondisi lain yang menjamin kondisi anaerob pada suhu $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama (20 ± 4) jam dan (44 ± 4) jam. Jika menggunakan *jar* anaerobik atau inkubator anaerobik, penyaring membran dapat diletakkan di permukaan media agar dengan posisi menghadap ke atas.

3.28.5.6.4 Interpretasi

Hitung semua koloni yang berwarna hitam setelah diinkubasi selama (20 ± 4) jam dan (44 ± 4) jam.

3.28.5.7 Pernyataan hasil

Dari jumlah koloni yang terhitung pada permukaan penyaring membran yang telah terkonfirmasi, hitung jumlah koloni Bakteri anaerob pereduksi sulfit pembentuk spora terdapat dalam 50 mL contoh yang disaring.

3.28.5.8 Laporan hasil uji

Laporan hasil uji harus sesuai dengan metode yang digunakan dan nyatakan hasil sebagai jumlah bakteri anaerob pereduksi sulfit pembentuk spora (*clostridia*) per 50 mL contoh.

Hasil yang dilaporkan sebaiknya didapat dari penghitungan normal (44 ± 4) jam. Jika ini tidak memungkinkan penghitungan pada (20 ± 4) jam dilaporkan sebagai perkiraan.

Laporan hasil uji juga harus menjelaskan secara detil yang tidak spesifik dituangkan pada standar ini atau setiap penyimpangan yang sekiranya dapat mempengaruhi hasil uji.

Laporan hasil uji harus termasuk semua informasi yang dibutuhkan untuk mengidentifikasi contoh uji secara lengkap.



Bibliografi

- ISO 8467:1993 *Water quality -- Determination of permanganate index*
- ISO 6222:1999 *Water quality -- Enumeration of culturable micro-organisms -- Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium*
- ISO 6461-2:1986 *Water quality -- Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (clostridia) -- Part 2: Method by membrane filtration*
- ISO 7899-2:2000 *Water quality -- Detection and enumeration of intestinal enterococci -- Part 2: Membrane filtration method*
- ISO 9308-1:2014 *Water quality -- Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria -- Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora*
- ISO 9377-2:2000 *Water quality -- Determination of hydrocarbon oil index -- Part 2: Method using solvent extraction and gas chromatography*
- ISO 11206:2011 *Water quality -- Determination of dissolved bromate -- Method using ion chromatography (IC) and post column reaction (PCR)*
- ISO 16266:2006 *Water quality -- Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa -- Method by membrane filtration*
- ISO 19250:2010 *Water quality -- Detection of Salmonella spp.*
- AOAC 990.06 *Organochlorine pesticides in water - gas chromatographic method*
- Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association; American Water Works Association: Water Environment Federation. 22th Ed. Washington DC, APHA 2012 :*
- 2120, Color, B. Visual Comparison Method.
- 2130, Turbidity, B Nephelo Metric Mehtod.
- 2540 C. Total Dissolved Solids Dried at 180°C
3030. Antimony
- 3030 B. Filtration for Dissolved and Suspended Metals
- 3120-B. Inductively Coupled Plasma (ICP) Method
3500. Fe. Iron, Electrothermal Atomic Absorption (3113B)
3500. Mn, Manganese, Electrothermal Atomic Absorption (3113B).
3500. Cr, Chromium, Electrothermal Atomic Absorption (3113B)
- 3500 Ba, Barium, Electrothermal Atomic Absorption (3113 B)
3500. B, Boron, ICP Method (3120), Curcumin Method (B).
3500. Se. Selenium, Electrothermal Atomic Absorption (3113B), Hydride Generation Atomic Absorption Method (3114B and C)
3500. Pb, Lead, Electrothermal Atomic Absorption (3113B)
3500. Cu, Copper, Electrothermal Atomic Absorption (3113B)
3500. Cd, Cadmium Electrothermal Atomic Absorption (3113B)
3500. Hg, Mercury, Spectrophotometer Atomic Absorption

3500. Ag, Silver, Electrothermal Atomic Absorption (3113B)

3500. As, Arsenic, Electrothermal Atomic Absorption (3113B). The hydride generation atomic absorption (3114B).

4500-B. Boron. Curcuminic method.

4500.Cl-. Chloride. B. Argentometric Method.

4500. Cl, Chlorine (Residual), D. DPD Colorimetric Method.

4500. CN-. Cyanide, E. Colorimetric Method.

4500-CO₂. Titrimetric method for free carbon dioxide

4500 F Fluoride. SPADNS Method.

4500, H⁺, pH Value, B. Electrometric Method.

4500' KMnO₄. Potassium Permanganate, B. Spectrophotometric Method.

4500 NO₂ B Nitrogen (Nitrite)

4500 NH₃ - Nitrogen (Ammonia). F. Phenate method.

4500. NO₃ -. Nitrogen (Nitrate).B. Ultraviolet Persulfate Spectrophotometric Screening Method.

4500-O. Azide modification

4500. SO₄²⁻ Sulfate. E. Turbidimetric Method.

5310, Total Organic Carbon (TOC), C. Persulfate Spectrophotometric Screening Method.

5540 C. Anionic surfactants as MBAS

6200 B. Volatile Organic Compounds - Purge and Trap Capillary-Column Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Method

6431 Polychlorinated Biphenyls (PCBs)